

02.11.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/6774

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2000年 4月 6日

REC'D 22 DEC 2000

出願番号
Application Number:

特願2000-105088

WIPO PCT

出願人
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

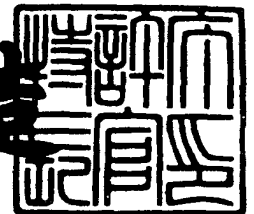
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年12月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3101514

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11-2101Q3

【提出日】 平成12年 4月 6日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 21/08

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

 【氏名】 花井 陳雄

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

 【氏名】 設楽 研也

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

 【氏名】 中村 和靖

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

 【氏名】 丹羽 倫平

【特許出願人】

 【識別番号】 000001029

 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

 【代表者】 平田 正

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 平成11年特許願第278291号

 【出願日】 平成11年 9月30日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ガングリオシドGD3に対するヒト型CDR移植抗体及びガングリオシドGD3に対する抗体の誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。

【請求項2】 ガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる抗体である、請求項1記載の抗体の誘導体。

【請求項3】 ハイブリドーマが産生する抗体がKM641である、請求項2記載の抗体の誘導体。

【請求項4】 ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である、請求項2記載の抗体の誘導体。

【請求項5】 ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）および軽鎖（L鎖）V領域を含む、請求項4記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

【請求項6】 ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域（C領域）およびL鎖C領域とからなる、請求項4記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

【請求項7】 H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含む、請求項5または6記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

【請求項8】 L鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む、請求項5または6記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

【請求項9】 H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む請求項5または6記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

【請求項10】 H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含み、L

鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む請求項5または6記載のヒト型キメラ抗体KM871の誘導体。

【請求項11】 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを含む、請求項4記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【請求項12】 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域（FR）を含む、請求項4記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【請求項13】 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域とからなるヒト型CDR移植抗体である請求項4記載の抗体の誘導体。

【請求項14】 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、請求項11～13のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【請求項15】 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項11～13のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【請求項16】 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項11～13のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【請求項17】 抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む請求項11～13のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【請求項18】 抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む請求項11～13のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【請求項19】 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む請求項11～13のいずれか1項に記載のヒト型CDR移

植抗体の誘導体。

【請求項20】 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む請求項11～13のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8871の誘導体。

【請求項21】 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv) およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項1記載の抗体断片の誘導体。

【請求項22】 抗体断片が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、請求項1または21記載の抗体断片の誘導体。

【請求項23】 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または21記載の抗体断片の誘導体。

【請求項24】 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または21記載の抗体断片の誘導体。

【請求項25】 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号55、抗体のL鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または21記載の抗体断片の誘導体。

【請求項26】 抗体断片が、ガングリオシドGD3に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、請求項1または21記載の抗体断片の誘導体。

【請求項27】 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または21記載の抗体断片の誘導体。

【請求項28】 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または21記載の抗体断片の誘導体。

【請求項29】 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号9、抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または21記載の抗体断片の誘導体。

【請求項30】 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または21

記載の抗体断片の誘導体。

【請求項 3 1】 抗体断片が、抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 1 記載の抗体断片の誘導体。

【請求項 3 2】 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 1 記載の抗体断片の誘導体。

【請求項 3 3】 蛋白質がサイトカインである、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片の誘導体。

【請求項 3 4】 サイトカインがヒトインターロイキン2 (hIL-2) である請求項 3 3 記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片の誘導体。

【請求項 3 5】 抗体の誘導体が、ヒト型キメラ抗体KM871とhIL-2とからなる請求項 3 4 記載の抗体の誘導体。

【請求項 3 6】 hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号 5 7 記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号 5 6 記載のアミノ酸配列を有する請求項35記載の抗体の誘導体。

【請求項 3 7】 抗体の誘導体が、ヒト型CDR移植抗体KM8871とhIL-2とからなる請求項 3 4 記載の抗体の誘導体。

【請求項 3 8】 hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号53記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号54記載のアミノ酸配列を有する請求項 1 記載の抗体の誘導体。

【請求項 3 9】 請求項 1 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載のガングリオシドGD 3 に特異的に反応するモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体をコードするDNA。

【請求項 4 0】 請求項 3 9 記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項 4 1】 請求項 4 0 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【請求項 4 2】 請求項 3 5 記載の抗体を生産する形質転換株KM871hIL2 (FER

M BP-6918)。

【請求項43】 請求項37記載の抗体を生産する形質転換株KM8871hIL2 (FERM BP-6791)。

【請求項44】 請求項41～43記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項1～38のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

【請求項45】 ガングリオシドGD3に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項46】 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを含む、請求項45記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項47】 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFRを含む、請求項45記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項48】 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域とからなる請求項45記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項49】 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、請求項46～48のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項50】 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項46～48のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項51】 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項46～48のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 5 2】 抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 6～4 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 5 3】 抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 6～4 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 5 4】 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 6～4 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 5 5】 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 6～4 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8871またはその抗体断片。

【請求項 5 6】 請求項 4 5～5 5 のいずれか 1 項に記載のガングリオシドGD 3 に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片をコードするDNA。

【請求項 5 7】 請求項 5 6 記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項 5 8】 請求項 5 7 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【請求項 5 9】 請求項 5 5 記載のヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換株KM8871 (FERM BP-6790) 。

【請求項 6 0】 請求項 5 8 または 5 9 記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項 4 5～5 5 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体またはその抗体断片を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

【請求項 6 1】 請求項 1～3 8 記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体、および請求項 4 5～5 5 記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片から選ばれるいずれか 1 種を有効成分として含有する癌の治療薬。

【請求項 6 2】 請求項 1～3 8 記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体、および請求項 4 5～5 5 記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片から選ばれるいずれか 1 種を有効成分として含有する癌の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ガングリオシドGD3（以下、GD3と表記する）に特異的に反応するモノクローナル抗体及び該抗体断片の誘導体、ならびにGD3に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体および該抗体断片に関する。本発明は更に、上記の誘導体、抗体および抗体断片をコードするDNA配列に関する。本発明は、該DNA配列を含んでなるベクター及び該ベクターにより形質転換された細胞に関する。本発明は更に、該形質転換細胞を用いた上記の誘導体、抗体および抗体断片の製造方法、ならびに上記の誘導体、抗体および抗体断片を用いる癌の診断薬および治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体をヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体（Human Anti Mouse Antibody：以下、HAMAと表記する）が誘導されることが知られている。HAMAは投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり [J. Clin. Oncol., 2, 881 (1984), Blood, 65, 1349 (1985), J. Natl. Cancer Inst., 80, 932 (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 82, 1242 (1985)]、投与されたマウス抗体の血中からの消失を速め [J. Nucl. Med.), 26, 1011 (1985), Blood, 65, 1349 (1985), J. Natl. Cancer Inst., 80, 937 (1988)]、マウス抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている [J. Immunol., 135, 1530 (1985), Cancer Res., 46, 6489 (1986)]。

【0003】

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物の抗体をヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域（Complementarity Determining Region：以下、CDRと表記する）移植抗体の様なヒト化抗体にすることが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域（以下、V領域と表記する）がヒト以外の動物の抗体で、定常領域（以下、C領域と表記する）がヒト

抗体である抗体であり [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 81, 6851 (1984)]、ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体のV領域中のCDRのアミノ酸配列をヒト抗体の適切な位置に移植した抗体である [Nature, 321, 522 (1986)]。これらのヒト化抗体は、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体に比較してヒトへの臨床応用上、様々な利点を有している。例えば、免疫原性及び血中での安定性に関しては、ヒト型キメラ抗体では、ヒトに投与した場合、マウス抗体に比べて血中半減期が約6倍伸びたことが報告されている [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 86, 4220 (1989)]。ヒト型CDR移植抗体では、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が4~5倍伸びたことが報告されている [J. Immunol., 147, 1352 (1991)]。即ち、ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。また、特に抗腫瘍抗体としての応用を考えた場合、抗体のFc領域（抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域）を介した補体依存性細胞障害活性（以下、CDC活性と表記する）や抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC活性と表記する）等の細胞障害活性の高さがその治療効果に重要であるが、こうした細胞障害活性に関しても、ヒトにおいてはヒト以外の動物の抗体のFc領域よりも、ヒト抗体のFc領域の方がヒト補体成分や、単核球、マクロファージ、NK細胞の様なFc受容体を細胞表面に有するヒトエフェクター細胞をより効率的に活性化できる為、より優れていることが報告されている。例えば、GD3に対するマウス抗体（以下、抗GD3マウス抗体と表記する）は、ヒト抗体のFc領域を有するヒト型キメラ抗体（以下、抗GD3キメラ抗体と表記する）に変換することにより、ヒトエフェクター細胞による腫瘍細胞障害活性が上昇することが報告されており [ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 144, 1382 (1990)]、また、CAMPATH-1抗原に対するヒト型CDR移植抗体についても同様の結果が報告されている [ネイチャー (Nature), 332, 323 (1988)]。

【 0 0 0 4 】

以上の結果は、ヒトへの臨床応用に用いる抗体としては、ヒト化抗体の方がマウス抗体等のヒト以外の動物の抗体より望ましいことを明確に示している。

更に、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fab'、F(ab')₂、一

本鎖抗体 [サイエンス (Science), 242, 423 (1988)]、ジスルフィド安定化V領域断片 [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 32, 249 (1995)] 等の、より分子量の小さい抗体の断片の作製が可能となっている。これらの断片は、完全な抗体分子に比べ分子量が小さいため、標的組織への移行性に優れている [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 52, 3402 (1992)]。これらの断片についても、ヒトへの臨床応用の場合には、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体よりもヒト化抗体に由来する方がより望ましいと考えられる。

【 0 0 0 5 】

シアル酸を含有する糖脂質の一種であるガングリオシドは動物の細胞膜を構成しており、親水性側鎖である糖鎖と、疎水性側鎖であるスフィンゴシン及び脂肪酸とから構成される分子である。ガングリオシドの種類と発現量は、細胞種、臓器種、動物種等によって異なることが知られている。更に細胞が癌化する過程においては、ガングリオシドの発現が量的及び質的に変化を起こすことも知られている [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 45, 2405 (1985)]。特に、本発明で注目したGD3は、正常細胞にはごく微量にしか存在しないが、メラノーマ、ザルコーマ、グリオーマ、ニューロblastoma等の癌細胞では多量に存在し [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 77, 6114 (1980); ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン (J. Exp. Med.), 155, 1133 (1982); キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 45, 4401 (1985)]、GD3に対する抗体 (以下、抗GD3抗体と表記する) は、これらの癌の治療に有用であると考えられている [メラノーマ・リサーチ (Melanoma Research), 7, S155 (1997)]。既に抗GD3マウス抗体であるR24では、メラノーマ患者への投与試験が行われたが、一部の患者で臨床効果は認められたものの、HAMAの誘導により抗体の血中からの消失が極めて速く、期待された程の効果には至っていない [メラノーマ・リサーチ (Melanoma Research), 7, S155 (1997)]。こうした観点から本発明者らは抗GD3抗体のより効果的なヒトへの臨床応用を目的として、本発明者らが作製した抗GD3マウス抗体KM641を基に、マウス抗体と同等の活性を有する抗GD3キメラ抗体の作製を試み、抗GD3キメラ抗体KM871の作製に成功した (特開平5-304989)。抗GD3キメラ抗体KM871は、抗GD3マ

ウス抗体に比べヒトでの免疫原性が低下し、血中半減期が延長し、より強い抗腫瘍効果が期待されている。しかし、他の抗GD3キメラ抗体のヒトでの臨床試験の結果、抗GD3キメラ抗体の中のマウス抗体に由来するV領域に対するヒト抗体が誘導され、アレルギー反応が惹起されることがあることが明らかとなった[キャンサー・ジャーナル・フロム・サイエンティフィック・アメリカン(Cancer J. From Scientific American), 3, S121 (1997)]。本発明者らが作製した抗GD3キメラ抗体KM871においても同様の反応が惹起されるか否かは、ヒトでの臨床試験結果を待たねばならないが、その様な問題が生じる可能性をできるだけ低くするためには、ヒトにおいて抗GD3キメラ抗体よりも更に免疫原性が低いと考えられるGD3に対するヒト型CDR移植抗体（以下、抗GD3CDR移植抗体と表記する）の作製が望まれる。しかし、これまでに抗GD3CDR移植抗体の作製の報告はない。

【 0 0 0 6 】

抗体断片に関しては、抗GD2マウス抗体由来の一本鎖抗体は作製されている[Hybridoma, 16, 335 (1997)]が、それ以外の抗体断片の作製の報告はなく、抗GD3抗体由来の抗体断片に関してはマウス抗体及びヒト化抗体に由来する抗体断片の作製の報告はない。従って、GD3に対するヒト化抗体（以下、抗GD3ヒト化抗体と表記する）に由来する抗体断片が作製できれば、ヒトにおいて優れた標的組織移行性を有し、かつ、免疫原性が低下することが期待される。

【 0 0 0 7 】

これまで述べてきた様に、ヒト化抗体及び該抗体断片は、単独の使用によっても診断及び治療の効果が期待されるが、更に他の分子との併用により、その効果をより高めることが検討されている。例えば、それら分子の一つとしてサイトカインが用いられている。サイトカインは免疫反応における細胞間相互作用を司る種々の液性因子の総称である。抗体の細胞障害活性には、CDC活性やADCC活性等が知られているが、ADCC活性は、単核球、マクロファージ、NK細胞の様なFc受容体を細胞表面に有するエフェクター細胞によって担われている[J. Immunol., 138, 1992 (1987)]。種々のサイトカインはこれらのエフェクター細胞を活性化することから、抗体のADCC活性等を高める目的で、抗体と組み合わせて投与することが行われている。例えば、抗GD2マウス抗体14.G2a及び抗GD2キメラ抗体ch14.1

8に関しては、サイトカインであるヒトインターロイキン2（以下、hIL-2と表記する）或いはヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（以下、hGM-CSFと表記する）と組み合わせてヒトに投与することが行われた [Cancer, 80, 317 (1997), Cancer J. From Scientific American, 3, S121 (1997)]。抗GD3マウス抗体R24に関しても、各種サイトカインとの併用療法が行われた [Cancer Res., 50, 7490 (1990), Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 1186, 345 (1992), J. Biol. Response Mod., 9, 319 (1990), Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 1182, 344 (1992), Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 1188, 346 (1992)]。しかし、これらの併用療法は、マウス抗体の抗原性或いはサイトカインの副作用から期待された程の効果は認められていない。そこで、抗体及びその抗体断片に放射性同位元素、蛋白質（サイトカイン、トキシン、酵素等）、低分子の薬剤等を化学的に、或いは、遺伝子工学的に融合させた誘導体の作製が行われ、それらの臨床応用が検討されている [New Eng. J. Med., 329, 459 (1993), Anticancer Res., 17, 1735 (1997), Blood, 78, 1173 (1991), J. Clin. Oncol., 15, 723 (1997), Bioconjugate Chem., 7, 606 (1997), Cancer, 61, 881 (1988), Jpn. J. Cancer Res., 85, 167 (1994), Antibody Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals, 3, 60 (1990), Surgery, 106, 533 (1989)]。これらの誘導体は、抗体の結合特異性に従って放射性同位元素、蛋白質（サイトカイン、トキシン、酵素等）、低分子の薬剤等を標的組織周辺に集積させることで、より効果的で副作用の少ない診断、治療を可能にすることが期待されている。例えば、上記に述べた併用療法に用いられたサイトカインの中で、ある程度の抗腫瘍効果を示したhIL-2に関しては、抗GD2キメラ抗体ch14.18との融合蛋白質が遺伝子工学的に作製され、マウスを用いた実験でその抗腫瘍効果が抗GD2キメラ抗体ch14.18及びhIL-2の同時投与よりも優れていることが報告されている [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 1428 (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9626 (1994), Cancer Immunol., Immunother., 42, 88 (1996), Blood, 91, 1706 (1998)]。しかし、抗GD3抗体に関しては、蛋白質（サイトカイン、トキシン、酵素等）、放射性同位元素、低分子の薬剤等を融合させた誘導体の作製の報告はない。従って、本発明の抗GD3ヒト化抗体及び該抗体断片についても各種サイトカインとの融合蛋白質を始めと

する、放射性同位元素、蛋白質（トキシン、酵素等）、低分子の薬剤等を融合させた誘導体ができれば、ヒト体内に投与した時に免疫原性が低下し、副作用が少なく、更には腫瘍局所におけるより強力な抗腫瘍効果が期待される。

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ヒトにおいて抗GD3マウス抗体及び抗GD3キメラ抗体よりも免疫原性が低く、かつ、強い抗腫瘍効果を示す抗GD3CDR移植抗体またはその抗体断片を提供することにある。また、抗GD3に対するモノクローナル抗体、特に抗GD3キメラ抗体や抗GD3CDR移植抗体などの抗GD3ヒト化抗体またはその抗体断片と、サイトカインなどとの融合蛋白質である抗体または抗体断片の誘導体を作製し、それを用いてヒトの腫瘍局所での強い抗腫瘍効果を始めとする治療効果を達成する方法を提供することにある。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、IgG3クラスに属する抗GD3マウス抗体KM641を生産するハイブリドーマ細胞KM641（FERM BP-3116）より抗体重鎖（以下、H鎖と表記する）及び軽鎖（以下、L鎖と表記する）をコードするcDNAを取得し、それらのV領域をコードするcDNAをヒト抗体H鎖及びL鎖C領域をコードするcDNAを有する動物細胞用発現ベクターにクローニングして抗GD3キメラ抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより抗GD3キメラ抗体KM871を培養上清中に生産する形質転換株KM871（FERM BP-3512）を既に作製している。更に、形質転換株KM871の培養上清より抗GD3キメラ抗体KM871を精製し、抗GD3キメラ抗体KM871が抗GD3マウス抗体KM641と同等の抗原結合活性、抗原結合特異性及びヒト癌細胞株移植マウスに対する強い抗腫瘍効果を示すことを明らかにし、抗GD3キメラ抗体KM871のヒトへの臨床応用における有用性を示している（特開平5-304989）。

【 0 0 1 0 】

本発明では、抗GD3マウス抗体KM641のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列から各CDRのアミノ酸配列を同定し、該CDRのアミノ酸配列とヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のフレームワーク領域（以下、FRと表記する）のアミノ酸配列から成るH鎖及びL

鎖V領域をコードするcDNAをヒト抗体H鎖及びL鎖C領域をコードするcDNAを有する動物細胞用発現ベクターにクローニングして抗GD3CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより抗GD3CDR移植抗体KM8871を培養上清中に生産する形質転換株KM8871 (FERM BP-6790) を作製した。更に、形質転換株KM8871の培養上清より抗GD3CDR移植抗体KM8871を精製し、抗GD3CDR移植抗体KM8871が抗GD3キメラ抗体KM871と同等の抗原結合活性、抗原結合特異性及びヒト癌細胞株に対する強い細胞障害活性を示すことを見出した。

【 0 0 1 1 】

さらに、抗GD3抗体、特に抗GD3CDR移植抗体KM8871のH鎖をコードするcDNAの3'末端にhIL-2をコードするcDNAを連結させてcDNAを構築し、該cDNA及びKM8871のL鎖をコードするcDNAを動物細胞用発現ベクターにクローニングして抗GD3CDR移植抗体KM8871とhIL-2との融合蛋白質（以下、KM8871-hIL-2と表記する）の発現ベクターを構築した。該KM8871-hIL-2発現ベクターを動物細胞へ導入することによりKM8871-hIL-2を培養上清中に生産する形質転換株KM8871hIL2 (FERM BP-6790) を作製した。更に、形質転換株KM8871hIL2の培養上清よりKM8871-hIL-2を精製し、KM8871-hIL-2が抗GD3CDR移植抗体KM8871と同等の抗原結合活性、抗原結合特異性及びhIL-2依存性増殖を示す細胞株に対してhIL-2と同等の増殖支持活性を示すことを見出した。更にはヒト末梢血単核球画分を用いた細胞障害活性において抗GD3CDR移植抗体KM8871に比べ、KM8871-hIL-2の活性が増強されることを確認し、本発明を完成させた。

【 0 0 1 2 】

本発明は、以下の（１）～（６２）に関する。

（１） ガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。

（２） ガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる抗体である、上記（１）記載の抗体の誘導体。

【 0 0 1 3 】

(3) ハイブリドーマが産生する抗体がKM641である、上記(2)記載の抗体の誘導体。

(4) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である、上記(2)記載の抗体の誘導体。

(5) ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域を含む、上記(4)記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

【0014】

(6) ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域(C領域)およびL鎖C領域とからなる、上記(4)記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

(7) H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含む、上記(5)または(6)記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

【0015】

(8) L鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む、上記(5)または(6)記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

(9) H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む上記(5)または(6)記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

【0016】

(10) H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む上記(5)または(6)記載のヒト型キメラ抗体KM871の誘導体。

(11) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを含む、上記(4)記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【0017】

(12) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナ

ル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域（FR）を含む、上記（４）記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

（１３） ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域とからなるヒト型CDR移植抗体である上記（４）記載の抗体の誘導体。

【0018】

（１４） 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１１）～（１３）のいずれか１項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

（１５） 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１１）～（１３）のいずれか１項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【0019】

（１６） 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１１）～（１３）のいずれか１項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

（１７） 抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む上記（１１）～（１３）のいずれか１項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【0020】

（１８） 抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む上記（１１）～（１３）のいずれか１項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

（１９） 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む上記（１１）～（１３）のいずれか１項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

【0021】

（２０） 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるア

ミノ酸配列を含む上記（１１）～（１３）のいずれか１項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8871の誘導体。

（２１） 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体（scFv）、ジスルフィド安定化V領域断片（dsFv）およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である上記（１）記載の抗体断片の誘導体。

【 0 0 2 2 】

（２２） 抗体断片が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２１）記載の抗体断片の誘導体。

（２３） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号５５で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２１）記載の抗体断片の誘導体。

【 0 0 2 3 】

（２４） 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号５６で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２１）記載の抗体断片の誘導体。

（２５） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号５５、抗体のL鎖V領域が配列番号５６で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２１）記載の抗体断片の誘導体。

【 0 0 2 4 】

（２６） 抗体断片が、ガングリオシドGD3に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２１）記載の抗体断片の誘導体。

（２７） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２１）記載の抗体断片の誘導体。

【 0 0 2 5 】

（２８） 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号５４で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２１）記載の抗体断片の誘導体。

（２９） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号９、抗体のL鎖V領域が配列番号５４で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２１）記載の抗体断片の誘導体。

【 0 0 2 6 】

(3 0) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、上記(1)または(2 1)記載の抗体断片の誘導体。

(3 1) 抗体断片が、抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(1)または(2 1)記載の抗体断片の誘導体。

【 0 0 2 7 】

(3 2) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(1)または(2 1)記載の抗体断片の誘導体。

(3 3) 蛋白質がサイトカインである、上記(1) ~ (3 2) のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片の誘導体。

【 0 0 2 8 】

(3 4) サイトカインがヒトインターロイキン2 (hIL-2) である上記(3 3) 記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片の誘導体。

(3 5) 抗体の誘導体が、ヒト型キメラ抗体KM871とhIL-2とからなる請求項3 4 記載の抗体の誘導体。

(3 6) hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号5 7 記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号5 6 記載のアミノ酸配列を有する上記(3 5) 記載の抗体の誘導体。

【 0 0 2 9 】

(3 7) 抗体の誘導体が、ヒト型CDR移植抗体KM8871とhIL-2とからなる上記(3 4) 記載の抗体の誘導体。

(3 8) hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号53記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号54記載のアミノ酸配列を有する上記(1) 記載の抗体の誘導体。

【 0 0 3 0 】

(39) 上記(1)～(38)のいずれか1項に記載のガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体をコードするDNA。

(40) 上記(39)に記載のDNAを含有する組換えベクター。

(41) 上記(40)に記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【0031】

(42) 上記(35)に記載の抗体を生産する形質転換株KM871hIL2 (FERM BP-6918)。

(43) 上記(37)に記載の抗体を生産する形質転換株KM8871hIL2 (FERM B P-6791)。

(44) 上記(41)～(43)に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に上記(1)～(38)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

【0032】

(45) ガングリオシドGD3に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(46) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを含む、上記(45)に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【0033】

(47) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFRを含む、上記(45)に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(48) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域とからなる上記(45)に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【0034】

(49) 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、上記(46)～(48)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(50) 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(46)～(48)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【0035】

(51) 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(46)～(48)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(52) 抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む、上記(46)～(48)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【0036】

(53) 抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、上記(46)～(48)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(54) 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、上記(46)～(48)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【0037】

(55) 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、上記(46)～(48)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8871またはその抗体断片。

(56) 上記(46)～(48)のいずれか1項に記載のガングリオシドGD3に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片をコードするDNA。

【0038】

(57) 上記(56)記載のDNAを含有する組換えベクター。

(58) 上記(57)記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(59) 上記(55)記載のヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換株KM8871 (FERM BP-6790)。

【0039】

(60) 上記(58)または(59)記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に上記(45)～(55)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体またはその抗体断片を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

(61) 上記(1)～(38)記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体、および上記(45)～(55)記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片から選ばれるいずれか1種を有効成分として含有する癌の治療薬。

【0040】

(62) 上記(1)～(38)記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体、および上記(45)～(55)記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片から選ばれるいずれか1種を有効成分として含有する癌の診断薬。

【0041】

【発明の実施の形態】

本発明はGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体に関する。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などがあげられる。

【0042】

ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウスなどに由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の

抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

【0043】

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体H鎖V領域（以下、HVまたはVHとも称す）および抗体L鎖V領域（以下、LVまたはVLとも称す）とヒト抗体のH鎖C領域（以下、CHとも称す）およびヒト抗体のL鎖C領域（以下、CLとも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

【0044】

本発明のヒト型キメラ抗体は、GD3に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0045】

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

【0046】

抗GD3キメラ抗体の具体例としては、特開平5-304989に記載のKM871があげられる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明の抗CD3CDR移植抗体は、GD3に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列に移植したV領

域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することによりヒト型CDR移植抗体を発現させ、製造することができる。

【 0 0 4 7 】

本発明のヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、該ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

【 0 0 4 8 】

抗GD3CDR移植抗体の具体例としては、抗体のH鎖V領域が配列番号9記載のアミノ酸配列、H鎖C領域がヒト抗体IgG1サブクラスのアミノ酸配列から成り、抗体のL鎖V領域が配列番号54記載のアミノ酸配列、L鎖C領域がヒト抗体 κ クラスのアミノ酸配列から成る抗体KM8871があげられる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

【 0 0 4 9 】

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFv等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することが

できる。

【0050】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

【0051】

抗体断片としては、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、scFv、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0052】

本発明のFabは、GD3に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

$F(ab')_2$ は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0053】

本発明の $F(ab')_2$ は、GD3に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab' は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0054】

本発明のFab' は、GD3に特異的に反応するF(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することによりFab'を発現させ、製造することができる。

【0055】

scFvは、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと称す）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLは、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のscFvは、GD3に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することによりscFvを発現させ、製造することができる。

【0056】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法[Protein Engineering, 7, 697 (1994)]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のdsFvに含まれるVHおよびVLはハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

【0057】

本発明のdsFvは、GD3に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFvを製造することができる。

CDRを含むペプチドは、H鎖またはL鎖CDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

【0058】

本発明のCDRを含むペプチドは、GD3に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得した後、該cDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することもできる。

【0059】

本発明の抗体の誘導体は、上述したGD3に特異的に反応する抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖のN末端側或いはC末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを化学的手法〔抗体工学入門（金光修著 1994年（株）地人書館）〕により結合させることにより製造することができる。

【0060】

または、GD3に特異的に反応する抗体または抗体断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入する。以上のような遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 等があげられ、例えば、クロラミンT法等により、抗体に結合させることができる。

【0061】

低分子の薬剤としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルピシン、ドキソルピシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン

のような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤〔臨床腫瘍学（日本臨床腫瘍研究会編 1996年 癌と化学療法社）〕、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、パニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法 昭和57年 医歯薬出版株式会社〕などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

【0062】

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、hIL-2、hGM-CSF、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（以下、hM-CSFと表記する）、ヒトインターロイキン12（以下、hIL-12と表記する）等があげられる。また、癌細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体または抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

【0063】

抗GD3ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の具体例としては、抗GD3CDR移植抗体KM8871とhIL-2との融合蛋白質、抗GD3キメラ抗体KM871とhIL-2との融合蛋白質があげられる。抗GD3CDR移植抗体KM8871とhIL-2との融合蛋白質としては、hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号53記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号54記載のアミノ酸配列、L鎖C領域がヒト抗体κクラスのアミノ酸配列を有するKM8871-hIL-2があげられる。抗GD3キメラ抗体KM871とhIL-2との融合蛋白質としては、hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号57記載

のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号56記載のアミノ酸配列、L鎖C領域がヒト抗体 κ クラスのアミノ酸配列を有するKM871-hIL-2があげられる。

以下に、GD3に特異的に反応するヒト化抗体およびGD3に特異的に反応する抗体または抗体断片の誘導体の作製方法について説明する。

【0064】

1. ヒト化抗体の作製

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域であることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC γ 1と表記する）及びヒト抗体のL鎖の κ クラスのC領域（以下、hC κ と表記する）等があげられる。ヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274[ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTRプロモーターとエンハンサー[バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター[セル(Cell), 41, 479 (1985)]とエンハンサー[セル(Cell), 33, 717 (1983)]等が

あげられる。

【 0 0 6 5 】

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプ或いは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい[ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (W097/10354)、pEE18[ハイブリドーマ(HYBRIDOMA), 17, 559 (1998)]等があげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

【 0 0 6 6 】

(2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは以下の様にして取得することができる。

【 0 0 6 7 】

マウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をプローブとして用い、H鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びL鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のH鎖及びL鎖V領域の全塩基配列を決定し、塩基配列よりH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定する。

【 0 0 6 8 】

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法[メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法[モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989]等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製)等があげられる。

【0069】

cdNAの合成及びcdNAライブラリー作製法としては、常法[モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super ScriptTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製)やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製)を用いる方法等があげられる。

【0070】

cdNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcdNAを組み込むベクターは、該cdNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ zap II (Stratagene社製)、λ gt10、λ gt11 [DNA クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach), 1, 49, (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)]及びpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)]等が用いられる。

【0071】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及びJM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【 0 0 7 2 】

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブラーク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR法と表記する；モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] によりH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを調製することもできる。

【 0 0 7 3 】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger, F.) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNAシーケンサー (Pharmacia社製) 等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

【0074】

決定した塩基配列からH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

【0075】

(3) ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、H鎖及びL鎖V領域の各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]と比較することによって見出すことができる。

【0076】

(4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体H鎖及びL鎖V領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域の5'末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝

子の上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

【 0 0 7 7 】

(5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは、以下の様にして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

【 0 0 7 8 】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入す

ることで、本項1の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

【0079】

(6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRのみをヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている[バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域では、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がCDRの移植に伴い、ヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基などを同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に置換し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている[バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。ヒト型CDR移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 112, 535, (1977)]或いはコンピューターモデリング[プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 1501 (1994)]等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それ

ぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

【 0 0 8 0 】

ヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸残基の置換は、改変用合成DNAを用いて本項1の(5)に記載のPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的のアミノ酸残基の置換が施されたことを確認する。

【 0 0 8 1 】

(7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、本項1の(5)及び(6)で構築したヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

【 0 0 8 2 】

例えば、本項1の(5)及び(6)でヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域を構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

【 0 0 8 3 】

(8) ヒト化抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、本項1の(4)及び(7)に記載のヒト化抗体発現ベクター、或いはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS-7細胞(ATCC CRL1651)が一般に用いられる[メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Methods in Nucleic Acids Res.), CRC press, 283 (1991)]。COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法[メソッズ・イン・ヌク

レイック・アシッツ・リサーチ(Methods in Nucleic Acids Res.), CRC press, 28 3 (1991)]、リポフェクション法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]等
 があげられる。

【0084】

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量及び抗原結合活性は
 酵素免疫抗体法[以下、ELISA法と表記する；アンティボディズ：ア・ラボラトリ
 ー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Labor
 atory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ
 ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Ac
 ademic Press Limited, 1996]等により測定できる。

【0085】

(9) ヒト化抗体の安定発現

本項1の(4)及び(7)に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な宿主細胞
 に導入することによりヒト化抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができ
 る。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[特
 開平2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等があ
 げられる。

【0086】

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させ
 ることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例え
 ば、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC
 CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(以下、dhfrと表記する)が欠損したC
 HO細胞[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイ
 エンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 77, 4216 (1980)]、ラットYB2/3HL.P2.G
 11.16Ag.20細胞(ATCC CRL1662、以下、YB2/0細胞と表記する)等があげられる
 。

【0087】

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に発現する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate（以下、G418と表記する：SIGMA社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地（日水製薬社製）、GIT培地（日本製薬社製）、EX-CELL302培地（JRH社製）、IMDM培地（GIBCO BRL社製）、Hybridoma-SFM培地（GIBCO BRL社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FBSと表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量及び抗原結合活性はELISA法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、dhfr増幅系等を利用してヒト化抗体の発現量を上昇させることができる。

【0088】

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる[アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動[以下、SDS-PAGEと表記する：ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)]やウエスタンブロッティング法[アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]等で測定することができる。

【0089】

(10) ヒト化抗体の活性評価

精製したヒト化抗体の抗原との結合活性、培養癌細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]等により測定できる。抗原陽性培養癌細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定し、評価することができる[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

【0090】

(11) ヒト化抗体の使用方法

ヒト化抗体は、ヒト由来の培養癌細胞株に発現しているGD3と特異的に結合し、かつCDC活性及びADCC活性等の細胞障害活性を示すため、肺癌、メラノーマ、グリオーマ、ニューロblastoma等のヒト癌等の診断、治療において有用であると考えられる。また、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において強い抗腫瘍効果を示し、かつ免疫原性を示さず、その治療効果が長期間に渡り持続することが期待される。

【0091】

本発明のヒト化抗体は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

【0092】

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤

、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0093】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0094】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

【0095】

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ～ 8mg/kg である。

【0096】

2.抗体または該抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の作製

(1) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子の構築

サイトカインをコードする遺伝子を適当な合成DNAを介して、抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖をコードする遺伝子の5'末端或いは3'末端に連結することにより、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子を構築することができる。また、サイトカインをコードする遺伝子をPCR法で増幅する際に、増幅用プライマーの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入し、抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖をコードする遺伝子の5'末端或いは3'末端に連結することにより、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子を構築することができる。サイトカインをコードする遺伝子は、染色体DNA、cDNAのいずれも用いることができる。構築した抗体または抗体断片とサイトカインの融合蛋白質をコードする遺伝子については、本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の配列であることを確認する。

【0097】

(2) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の発現ベクターの構築

本項1の(4)及び(7)に記載のヒト化抗体発現ベクター上の抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖をコードする遺伝子の一部またはすべてを、本項2の(1)に記載の抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子と置換することによって、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の発現ベクターを構築することができる。例えば、抗体のH鎖のC末端にサイトカインが融合した融合蛋白質を作製する場合は、本項2の(1)において、抗体または抗体断片のH鎖C領域をコードする遺伝子の3'末端にサイトカインをコードする遺伝子を連結して抗体または抗体断片のH鎖C領域とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子を構築し、該遺伝子と本項1の(4)及び(7)に記載のヒト化抗体発現ベクター上の抗体または抗体断片のH鎖C領域をコードする遺伝子を置換することにより、発現ベクターを構築することができる。

【0098】

(3) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の安定発現

本項2の(2)に記載の抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の発現ベクターを用いて本項1の(9)に記載した方法に従い、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の安定発現を行うことにより、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質を安定に発現する形質転換株を得、その培養上清から抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質を精製し、その分子量等を解析することができる。

【0099】

(4) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質のin vitro活性評価
精製した抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の活性のうち、抗体部分の活性、すなわち抗原との結合活性、培養癌細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法等により測定できる。また、抗原陽性培養癌細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定し、評価することができる。一方、サイトカイン部分の活性は、例えば、該サイトカインに対して濃度依存的な増殖を示す培養細胞株の増殖支持活性を指標に評価することができる[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 91, 9626 (1994)]。

【0100】

(5) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質のin vivo活性評価
抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の抗腫瘍効果は、抗原を発現している培養マウス癌細胞株を正常な免疫系を有する野生型マウスへ移植した同系移植マウスモデルに投与することにより評価することができる。また、該同系移植マウスモデルへの抗体単独、サイトカイン単独又は抗体とサイトカインの同時投与のそれぞれの場合を比較することにより、生体内における抗腫瘍効果を評価することができる[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 93, 7826 (1996)]。
現在までにヒトメラノーマやニューロblastomaに特異的に発現するGD2又はGD3陽性のマウス培養細胞株の報告はない。しかしGD2又はGD3の生合成前駆体であるGM2又はGM3を発現するマウス培養細胞株に、特異的に発現させたいガングリオシドの合成酵素遺伝子を導入することにより、GD2又はGD3陽性の形質転換株を作

製することができる[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 91, 10455 (1994)]。該形質転換株を正常な免疫系を有する野生型マウスへ移植することにより、同系移植マウスモデルを作製することができる。

以上のようにして作製したマウスモデルは、目的のガングリオシドに対する抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の in vivo 評価に用いることができる。

【0101】

(6) ヒト化抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の使用方法
本発明の抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質は、ヒト由来の培養癌細胞株に発現しているGD3と特異的に結合し、かつCDC活性及びADCC活性等の細胞障害活性を示すため、肺癌、メラノーマ、グリオーマ、ニューロブラストーマ等のヒト癌等の診断、治療において有用であると考えられる。本発明のヒト化抗体または抗体断片は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において強い抗腫瘍効果を示し、かつ免疫原性を示さず、その治療効果が長期間に渡り持続することが期待され、更に、融合させたサイトカイン部分の活性により癌の近傍で免疫担当細胞を活性化できることから、抗体単独、サイトカイン単独或いは抗体とサイトカインの同時投与等に比べ、より強い抗腫瘍効果が期待され、また、サイトカインの全身投与に比べ、副作用の低減が期待される。

【0102】

本発明のヒト化抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、蛋白質製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

【0103】

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0104】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0105】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該融合蛋白質そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該融合蛋白質を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

【0106】

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該融合蛋白質および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ～ 8mg/kg である。

【0107】

以下に、本発明の実施例を示す。

【0108】

【実施例】

実施例1. 抗GD3CDR移植抗体の作製

1. 抗GD3マウス抗体KM641のV領域のアミノ酸配列の解析

特開平5-304989に開示されている抗GD3マウス抗体KM641のH鎖V領域の全アミノ酸配列を配列番号1に、L鎖V領域の全アミノ酸配列を配列番号2に示す。両配列と既知の抗体のアミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]及び精製した抗GD3マウス抗体KM641のH鎖及びL鎖のN末端アミノ酸配列の解析結果との比較から、H鎖についてはアミノ酸配列の-19から-1番目が、L鎖についてはアミノ酸配列の-20から-1番目が分泌シグナル配列であることが確認された。配列番号55に分泌型H鎖V領域の全アミノ酸配列を、配列番号56に分泌型L鎖V領域の全アミノ酸配列を示す。また、H鎖V領域のCDR1、2及び3は配列番号3、4及び5、L鎖V領域のCDR1、2及び3は配列番号6、7及び8に示すアミノ酸配列であることが明らかとなった。

【0109】

2. 抗体の各種ガングリオシドに対する結合活性の測定 (ELISA法)

抗体の各種ガングリオシドに対する結合活性は以下の様にして測定した。

2nmolの各種ガングリオシドを $10\mu\text{g}$ のジパルミトイルフォスファチジルコリン (SIGMA社製)と $5\mu\text{g}$ のコレステロール (SIGMA社製)とを含む2mlのエタノール溶液に溶解した。該溶液の $20\mu\text{l}$ (20pmol/ウェルとなる) または該溶液をエタノールで希釈した溶液の $20\mu\text{l}$ を96ウェルのELISA用のプレート (Greiner社製)の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%BSAを含むPBS (以下、1%BSA-PBSと表記する)を $100\mu\text{l}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト化抗体の

各種希釈溶液を50 μ l/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS（以下、Tween-PBSと表記する）で洗浄後、1%BSA-PBSで1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(γ)抗体溶液（Kirkegaard & Perry Laboratories社製）を二次抗体溶液として、50 μ l/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液（2,2'-アジノービス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）アンモニウムの0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液（pH4.2）に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 μ l/mlで添加した溶液）を50 μ l/ウェルに加えて発色させ、415nmの吸光度（以下、OD415と表記する）を測定した。

【0110】

3. 抗GD3CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAの構築

（1）抗GD3CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列の設計

まず、抗GD3CDR移植抗体のH鎖V領域のアミノ酸配列を以下の様にして設計した。実施例1の1項で同定した抗GD3マウス抗体KM641のH鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のH鎖V領域のFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のH鎖V領域をそのアミノ酸配列の相同性から3種類のサブグループ（HSG I～III）に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), U S Dept. Health and Human Services, 1991]。それら共通配列は、ヒトにおいてより免疫原性が低下する可能性が考えられることから、それら共通配列を基に抗GD3CDR移植抗体のH鎖V領域のアミノ酸配列を設計することとした。より活性の高い抗GD3CDR移植抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体のH鎖V領域の3種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、KM641のH鎖V領域のFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択することとした。第1表には、相同性の検索結果を示した。第1表に示した様に、KM641のH鎖V領域のFRのアミノ酸配列はサブグループIIと最も高い相同性を有していた。

【0111】

【表 1】

第 1 表
ヒト抗体のH鎖V領域の各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列とKM641のH鎖V領域
のFRのアミノ酸配列との間の相同性

HSGI	HSGII	HSGIII
62.1%	56.3%	78.2%

【0112】

以上の結果から、ヒト抗体のH鎖V領域のサブグループIIIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗GD3マウス抗体KM641のH鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植し、抗GD3CDR移植抗体のH鎖V領域のアミノ酸配列HV.0を設計した。

次に、抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のアミノ酸配列を以下の様にして設計した。実施例1の1項で同定した抗GD3マウス抗体KM641のL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のL鎖V領域のFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のL鎖V領域をそのアミノ酸配列の相同性から4種類のサブグループ(HSG I~IV)に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), U S Dept. Health and Human Services, 1991]。そこでH鎖の場合と同様にして、ヒト抗体のL鎖V領域の4種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、KM641のL鎖V領域のFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。第2表には、相同性の検索結果を示した。第2表に示した様に、KM641のL鎖V領域のFRのアミノ酸配列はサブグループIと最も高い相同性を有していた。

【0113】

【表 2】

第 2 表
ヒト抗体のL鎖V領域の各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列とKM641のL鎖V領域
のFRのアミノ酸配列との間の相同性

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
78.2%	60.0%	62.5%	67.5%

【0114】

以上の結果から、ヒト抗体のL鎖V領域のサブグループIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗GD3マウス抗体KM641のL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植し、抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のアミノ酸配列LV.0を設計した。

上記で設計した抗GD3CDR移植抗体のH鎖V領域のアミノ酸配列HV.0及びL鎖V領域

のアミノ酸配列LV.0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗GD3マウス抗体KM641のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列であるが、一般に、ヒト型CDR移植抗体では、マウス抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは活性が低下してしまうことが多く、それを回避するため、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているFRのアミノ酸残基のうち、活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基をCDRのアミノ酸配列とともに移植することが行われている。そこで、本実施例においても、活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を同定することを検討した。まず、上記で設計した抗GD3CDR移植抗体のH鎖V領域のアミノ酸配列HV.0及びL鎖V領域のアミノ酸配列LV.0よりなる抗体V領域（以下、HV0LV0と表記する）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標の作製にはソフトウェアAbM（Oxford Molecular社製）、三次元構造の表示にはソフトウェアPro-Explore（Oxford Molecular社製）を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗GD3マウス抗体KM641のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、HV0LV0のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列において、抗GD3マウス抗体KM641と異なっている残基について順次、抗GD3マウス抗体KM641の相当する位置に見られる残基へ置換したアミノ酸配列から成る三次元構造モデルを同様にして構築し、抗GD3マウス抗体KM641、HV0LV0及び改変体のV領域の三次元構造を比較した。その結果、HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で、抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の活性に影響を与えると考えられる残基を選択した。それらの選択したHV0LV0のFRのアミノ酸残基をマウス抗体KM641に見られるアミノ酸残基へ改変した結果、配列番号9に示す抗GD3CDR移植抗体のH鎖V領域のアミノ酸配列hKM641H及び配列番号10に示す抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のアミノ酸配列hKM641Lを設計した。hKM641Hにおいては、HV.0のFRのアミノ酸配列の中で、10番目のGly、11番目のLeu、20番目のLeu、28番目のThr、84番目のAsn、91番目のThr、95番目のTyr、97番目のAla、115番目のValをそれぞれ、抗GD3マウス抗体KM641のH鎖V領域の相当する位置に見られるアミノ酸残基であるAsp、Phe、Val、Ala、Arg、Ser、Phe、Thr、Leuに置換した。hKM641Lにおいては、LV.0のFRのアミノ酸配列の中で、49番目のTyr、65番目のSer、71番目のPheをそれぞれ、抗GD3マウス抗体KM641のL鎖V領域の相当する

位置に見られるアミノ酸残基であるTyr、Ser、Pheに置換した。

【0115】

(2) 抗GD3CDR移植抗体のH鎖V領域をコードするcDNAの構築

実施例1の3項(1)で設計した抗GD3CDR移植抗体のH鎖V領域のアミノ酸配列hKM641HをコードするcDNAをPCR法を用いて以下の様にして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号1に記載の抗GD3マウス抗体KM641のH鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。一つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度[シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した。決定した遺伝子コドンを繋げて、完全な抗体V領域のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を設計し、更に5'末端と3'末端にPCR時の増幅用プライマーの結合塩基配列(ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む)を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約100塩基ずつ計6本の塩基配列に分け(隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する様にする)、更に、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で自動DNA合成機(380A, Applied Biosystems社製)を用いて合成した。

【0116】

実際には、配列番号11から配列番号16の6本の合成DNAを合成した。各DNAを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に50 μ lの10mMトリス-塩酸(pH8.3)、50mM塩化カリウム、1.5mM塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、200 μ M dNTPs、0.5 μ M M13 primer RV(宝酒造社製)、0.5 μ M M13 primer M4(宝酒造社製)及び2単位のTaKaRa Taq DNA polymerase(宝酒造社製)よりなる緩衝液に加え、50 μ lの鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラー(PJ480, PERKIN ELMER社製)にセットし、94℃にて2分間、55℃にて2分間、72℃にて2分間のサイクルを30サイクル行った。該反応液をQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて添付の使用説明書に従い、精製後、30 μ lの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム及び1

mM DTTから成る緩衝液とし、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/mlBSA及び0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約0.44kbのApaI-NotI断片を約0.2 μ g回収した。

【 0 1 1 7 】

次に、プラスミドpBluescript SK(-)（Stratagene社製）の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/mlBSA及び0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約2.95kbのApaI-NotI断片を約2 μ g回収した。

【 0 1 1 8 】

次に、上記で得られた抗GD3CDR移植抗体のH鎖V領域のPCR産物のApaI-NotI断片0.1 μ gとプラスミドpBluescript SK(-)のApaI-NotI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（Pharmacia社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有する図1に示したプラスミドphKM641Hを得た。

【 0 1 1 9 】

（3）抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域をコードするcDNAの構築

実施例1の3項（1）で設計した抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のアミノ酸配列

hKM641LをコードするcDNAをH鎖V領域と同様にPCR法を用いて以下の様にして構築した。但し、分泌シグナル配列としては、配列番号2に記載の抗GD3マウス抗体KM641のL鎖の配列を用いた。

【 0 1 2 0 】

まず、配列番号17から配列番号22の6本の合成DNAを自動DNA合成機（380A、Applied Biosystems社製）を用いて合成した。合成した各DNAを最終濃度が $0.1\mu\text{M}$ となる様に $50\mu\text{l}$ の 10mM トリス-塩酸（ $\text{pH}8.3$ ）、 50mM 塩化カリウム、 1.5mM 塩化マグネシウム、 0.001% ゼラチン、 $200\mu\text{M}$ dNTPs、 $0.5\mu\text{M}$ M13 primer RV（宝酒造社製）、 $0.5\mu\text{M}$ M13 primer M4（宝酒造社製）及び2単位のTaKaRa Taq DNA polymerase（宝酒造社製）よりなる緩衝液に加え、 $50\mu\text{l}$ の鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラー（PJ480、PERKIN ELMER社製）にセットし、 94°C にて2分間、 55°C にて2分間、 72°C にて2分間のサイクルを30サイクル行った。該反応液をQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の使用説明書に従い、精製後、 $30\mu\text{l}$ の 50mM トリス-塩酸（ $\text{pH}7.5$ ）、 100mM 塩化ナトリウム、 10mM 塩化マグネシウム、 1mM DTT及び $100\mu\text{g/ml}$ BSAから成る緩衝液とし、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）及び制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて 37°C で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約 0.39kb のEcoRI-SplI断片を約 $0.2\mu\text{g}$ 回収した。

【 0 1 2 1 】

次に、特開平10-257893に記載のプラスミドpBSL3の $3\mu\text{g}$ を $10\mu\text{l}$ の 50mM トリス-塩酸（ $\text{pH}7.5$ ）、 100mM 塩化ナトリウム、 10mM 塩化マグネシウム、 1mM DTT及び $100\mu\text{g/ml}$ BSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）及び制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて 37°C で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約 2.95kb のEcoRI-SplI断片を約 $2\mu\text{g}$ 回収した。

【 0 1 2 2 】

次に、上記で得られた抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のPCR産物のEcoRI-SplI断片 $0.1\mu\text{g}$ とプラスミドpBSL3のEcoRI-SplI断片 $0.1\mu\text{g}$ を全量 $20\mu\text{l}$ の滅菌水に加え

、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia社製) に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia社製) により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有する図2に示したプラスミドphKM641Lを得た。

【 0 1 2 3 】

4. 抗GD3CDR移植抗体の動物細胞を用いた一過性発現による活性評価

抗GD3CDR移植抗体の活性評価をより迅速に行なうために、COS-7細胞(ATCC CR L1651)を用いて抗GD3CDR移植抗体の一過性発現を以下の様にして行なった。

(1) 抗GD3キメラ抗体KM871の一過性発現ベクターpT641の構築

抗GD3CDR移植抗体の一過性発現による活性評価における陽性対照として用いるため、抗GD3キメラ抗体KM871の一過性発現ベクターpT641を以下の様にして構築した。

【 0 1 2 4 】

一般に、動物細胞を用いた一過性発現の効率は導入された発現ベクターのコピー数に依存していることから、より大きさの小さい発現ベクターの方が発現効率が低いことが考えられた。そこで特開平10-257893に記載の抗ガングリオシドGM2キメラ抗体KM966の一過性発現ベクターpT796と特開平5-304989に記載の抗GD3マウス抗体KM641のH鎖V領域を有するプラスミドpKM641HF1及び抗GD3マウス抗体KM641のL鎖V領域を有するプラスミドpKM641LA2を用いて抗GD3キメラ抗体KM871の一過性発現ベクターpT641を以下の様にして構築した。

【 0 1 2 5 】

まず、特開平5-304989に記載の抗GD3マウス抗体KM641のL鎖V領域を有するプラスミドpKM641LA2の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素HindIII(宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素Eco

RI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約0.35kbのHindIII-EcoRI断片を約0.2 μ g回収した。

【 0 1 2 6 】

次に、特開平10-257893に記載の抗ガングリオシドGM2キメラ抗体KM966の一過性発現ベクターpT796の3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT及び100 μ g/mlBSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）及び制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約9.20kbのEcoRI-SplI断片を約2 μ g回収した。

【 0 1 2 7 】

次に、配列番号23および配列番号24に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNAを自動DNA合成機（380A、Applied Biosystems社製）を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 μ gずつを15 μ lの滅菌水に加え、65℃で5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 μ lの10倍緩衝液（500mMトリス-塩酸（pH7.6）、100mM塩化マグネシウム、50mMDTT）と2 μ lの10mMATPを加え、更に10単位のT4 Polynucleotide Kinase（宝酒造社製）を加えて37℃で30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

【 0 1 2 8 】

次に、上記で得られたプラスミドpKM641LA2由来のHindIII-EcoRI断片0.1 μ gとプラスミドpT796由来のEcoRI-SplI断片0.1 μ gとリン酸化合成DNA0.05 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（Pharmacia社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図3に示したプラスミドpT796H641Lを得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

【0129】

次に、プラスミドpBluescript SK(-) (Stratagene社製) の3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT 及び100 μ g/mlBSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XbaI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、30 μ lの30mM酢酸ナトリウム (pH5.0)、100mM塩化ナトリウム、1mM酢酸亜鉛及び5%グリセロールから成る緩衝液に加え、更に30単位の修飾酵素Mung Bean Nuclease (宝酒造社製) を加えて25℃で15分間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約2.95kbのBlunt end-ApaI断片を約2 μ g回収した。

【0130】

次に、プラスミドpKM641HF1の3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、制限酵素消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.44kbのBlunt end-ApaI断片を約0.2 μ g回収した。

【0131】

次に、上記で得られたプラスミドpBluescript SK(-)のBlunt end-ApaI断片0.1 μ gとプラスミドpKM641HF1のBlunt end-ApaI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、

図4に示したプラスミドpBS641Hを得た。

【0132】

次に、上記で得られたプラスミドpT796H641Lの3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/mlBSA及び0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約9.16kbのApaI-NotI断片を約0.2 μ g回収した。

【0133】

次に、上記で得られたプラスミドpBS641Hの3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/mlBSA及び0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約0.44kbのApaI-NotI断片を約2 μ g回収した。

【0134】

次に、上記で得られたプラスミドpT796H641L由来のApaI-NotI断片0.1 μ gとプラスミドpBS641H由来のApaI-NotI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製)を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図5に示したプラスミドpT641を得た。

【0135】

(2) 抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターの構築

上記実施例 1 の 4 項 (1) で得られた抗GD3キメラ抗体一過性発現ベクターpT641と実施例 1 の 3 項 (2) 及び (3) で得られたプラスミドphKM641H及びphKM641Lを用いて抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターを以下の様にして構築した。

【 0 1 3 6 】

まず、実施例 1 の 3 項 (2) で得られたプラスミドphKM641Hの3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/mlBSA及び0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.44kbのApaI-NotI断片を約0.2 μ g回収した。

【 0 1 3 7 】

次に、実施例 1 の 4 項 (1) で得られたプラスミドpT641の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/mlBSA及び0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約9.16kbのApaI-NotI断片を約2 μ g回収した。

【 0 1 3 8 】

次に、上記で得られたプラスミドphKM641H由来のApaI-NotI断片0.1 μ gとプラスミドpT641由来のApaI-NotI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図 6 に示したプラスミドpT641HCDRを得た。

【 0 1 3 9 】

次に、実施例 1 の 3 項 (3) で得られたプラスミド phKM641L の $3\mu\text{g}$ を $10\mu\text{l}$ の 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、 100mM 塩化ナトリウム、 10mM 塩化マグネシウム、 1mM DTT 及び $100\mu\text{g/ml}$ BSA から成る緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) 及び制限酵素 SphI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い、約 0.39kb の EcoRI-SphI 断片を約 $0.2\mu\text{g}$ 回収した。

【 0 1 4 0 】

次に、実施例 1 の 4 項 (1) で得られたプラスミド pT641 及び上記で得られたプラスミド pT641HCDR の $3\mu\text{g}$ を $10\mu\text{l}$ の 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、 100mM 塩化ナトリウム、 10mM 塩化マグネシウム、 1mM DTT 及び $100\mu\text{g/ml}$ BSA から成る緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) 及び制限酵素 SphI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い、それぞれのプラスミド由来の約 9.20kb の EcoRI-SphI 断片を約 $2\mu\text{g}$ ずつ回収した。

【 0 1 4 1 】

次に、上記で得られたプラスミド phKM641L 由来の EcoRI-SphI 断片 $0.1\mu\text{g}$ とプラスミド pT641 由来の EcoRI-SphI 断片 $0.1\mu\text{g}$ を全量 $20\mu\text{l}$ の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia 社製) を用いて連結した。また、上記で得られたプラスミド phKM641L 由来の EcoRI-SphI 断片 $0.1\mu\text{g}$ とプラスミド pT641HCDR 由来の EcoRI-SphI 断片 $0.1\mu\text{g}$ を全量 $20\mu\text{l}$ の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia 社製) を用いて連結した。この様にして得られたそれぞれの組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換し、図 7 に示したプラスミド pT641LCDR 及び pT641HLCDR を得た。

【 0 1 4 2 】

(3) 抗 GD3 キメラ抗体及び抗 GD3CDR 移植抗体の動物細胞を用いた一過性発現による活性評価

上記実施例 1 の 4 項 (1) 及び (2) で得られた抗GD3キメラ抗体の一過性発現ベクターpT641、抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターpT641HLCDR及びマウス抗体とヒト型CDR移植抗体のV領域を有する抗GD3ハイブリッド抗体の一過性発現ベクターpT641HCDR、pT641LCDRを用いて抗体の一過性発現を以下の様にして行った。

【 0 1 4 3 】

COS-7細胞 (ATCC CRL1651) を 1×10^5 細胞/mlで6ウェルプレート (Falcon社製) に2mlずつ分注し、37℃で一晩培養した。100 μ lのOPTI-MEM培地 (GIBCO BRL社製) に各発現ベクターの2 μ gを加え、更に100 μ lのOPTI-MEM培地に10 μ lのLIPOFECTAMINE Reagent (GIBCO BRL社製) を添加した溶液を加え、室温で40分間反応させ、DNA-リボソームの複合体を形成させた。一晩培養したCOS-7細胞を2mlのOPTI-MEM培地 (GIBCO BRL社製) で2回洗浄後、複合体を含む溶液に0.8mlのOPTI-MEM培地を添加した溶液を加え、37℃で7時間培養後、溶液を除去し、2mlの10%FBSを含むDME培地 (GIBCO BRL社製) を添加し、37℃で培養した。各発現ベクターの導入後、72時間後に培養上清を回収し、必要に応じて濃縮操作を行ない、実施例 1 の 2 項に記載のELISA法により培養上清中の抗GD3ヒト化抗体のGD3 (DIA-IATRON社製) に対する結合活性を、本項 (4) に示すELISA法により培養上清中の抗GD3ヒト化抗体の濃度を測定し、それらの値から活性を、陽性対照である抗GD3キメラ抗体の活性を100とした時の相対活性値 (%) として算出した。その結果を図 8 に示した。図 8 に示した様に、一過性発現ベクターpT641HCDRに由来する抗GD3ハイブリッド抗体 (H鎖V領域がヒト型CDR移植抗体由来で、L鎖V領域がキメラ抗体由来) は、一過性発現ベクターpT641に由来する抗GD3キメラ抗体とほぼ同等の結合活性を示したが、一方、一過性発現ベクターpT641LCDRに由来する抗GD3ハイブリッド抗体 (H鎖V領域がキメラ抗体由来で、L鎖V領域がヒト型CDR移植抗体由来) は、抗GD3キメラ抗体に比べ約50%の結合活性を示した。更に、一過性発現ベクターpT641HLCDRに由来する抗GD3CDR移植抗体では、抗GD3キメラ抗体に比べ約5%の結合活性しか示さず、活性の著しい低下が認められた。

【 0 1 4 4 】

以上の結果から、実施例 1 の 3 項 (1) で設計したH鎖及びL鎖V領域を有する

抗GD3CDR移植抗体では、その結合活性が著しく低下してしまうこと、また、その活性低下の主な原因はL鎖V領域にあると考えられるが、抗GD3キメラ抗体のH鎖V領域との組合せで約50%の活性が認められることから、特にH鎖V領域との相互作用部位に問題があることが示唆された。そこで、実施例1の3項(1)で設計したL鎖V領域のアミノ酸残基の更なる改変による活性の上昇を検討した。

【0145】

(4) ELISA法による一過性発現培養上清中のヒト化抗体の濃度の測定

ヤギ抗ヒトIgG (γ -chain) 抗体 (医学生物学研究所社製) をPBSで400倍希釈した溶液の50 μ lを96ウェルのELISA用のプレート (Greiner社製) の各ウェルに分注し、4℃で一晩反応させた。抗体溶液を除去後、1%BSA-PBSを100 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、実施例1の4項(3)で得られた一過性発現培養上清或いは精製した抗GD3キメラ抗体KM871の各種希釈液を50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト κ L鎖抗体 (Zymed社製) をPBSで500倍希釈した溶液を50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2' アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウム の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 μ l/mlで添加した溶液] を50 μ l/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

【0146】

5. 抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のアミノ酸残基の改変による結合活性の上昇

実施例1の3項(1)で設計した抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のアミノ酸残基の改変による結合活性の上昇を以下の様にして行った。

(1) 抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のアミノ酸残基の改変及び改変したL鎖V領域をコードするcDNAの構築

まず、実施例1の3項(1)で構築した各種抗体のV領域の三次元構造のコンピュータモデルより、H鎖V領域とL鎖V領域の相互作用部位に位置するアミノ酸残基及びL鎖V領域の各CDRの立体構造に影響を与えられと考えられるアミノ酸残基で、かつ、ヒト型CDR移植抗体のL鎖V領域においてマウス抗体とは異なっている

アミノ酸残基を同定した。その結果、配列番号10に示した抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のアミノ酸配列であるhKM641Lの7番目のSer、8番目のPro、12番目のSer、41番目のGly、44番目のPro、72番目のThr、77番目のSer、83番目のPhe、87番目のTyrを同定した。これらのアミノ酸残基について、マウス抗体に見られるアミノ酸残基へ改変することにより、以下の8種類の改変抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域を設計した。即ち、hKM641NLにおいてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、8番目のProをAla、12番目のSerをPro、44番目のProをVal、87番目のTyrをPheに、hKM641Lm-1においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、7番目のSerをThr、8番目のProをAla、12番目のSerをProに、hKM641Lm-4においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、87番目のTyrをPheに、hKM641Lm-6においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、41番目のGlyをAsp、44番目のProをValに、hKM641Lm-7においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、72番目のThrをSer、77番目のSerをAsn、83番目のPheをIleに、hKM641Lm-8においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、77番目のSerをAsnに、hKM641Lm-9においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、83番目のPheをIle、87番目のTyrをPheに、hKM641Lm-69においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、41番目のGlyをAsp、44番目のProをVal、83番目のPheをIle、87番目のTyrをPheにそれぞれ改変した。これら改変したL鎖V領域のうち、hKM641NLとhKM641Lm-69を除く6種類の改変したL鎖V領域をコードするcDNAはPCR法を用いた変異導入法により以下の様にして構築した。即ち、変異を導入する為のアンチセンス鎖及びセンス鎖のDNAプライマーを自動DNA合成機（380A、Applied Biosystems社製）を用いて合成し、プラスミドphKM641LのIngを鋳型として最終濃度0.5 μ MのM13 Primer RV（宝酒造社製）とアンチセンス鎖DNAプライマー及びM13 Primer M4（宝酒造社製）とセンス鎖DNAプライマーを用いて第一PCRを実施例1の3項（2）に記載の方法に従って行った。該各反応液をQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、20 μ lの10mMトリス-塩酸（pH8.0）で溶出、精製した後、各溶出液の5 μ lを用いて第二PCRを実施例1の3項（2）に記載の方法に従って行った。該反応液をQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、精製後、30 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT及び100 μ g/mlBSAから成る緩衝液とし、更

に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）及び制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.2 μ g回収した。

【 0 1 4 7 】

次に、上記で得られた改変した抗GD3CDR移植抗体のL鎖V領域のPCR産物のEcoRI-SplI断片0.1 μ gと実施例1の3項（3）で得られたプラスミドpBSL3のEcoRI-SplI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（Pharmacia社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動して塩基配列を決定し、目的の改変が施されたcDNAを有するプラスミドを得た。

【 0 1 4 8 】

具体的には、アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号25の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号26の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号27に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-1を得た。また、配列番号27には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-1を併記した。

【 0 1 4 9 】

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号28の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号29の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号30に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-4を得た。また、配列番号30には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-4を併記した。

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号31の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号32の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号33に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-6を得た。また、配列番号33には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-6を併記した。

【 0 1 5 0 】

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号34の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号35の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号36に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-7を得た。また、配列番号36には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-7を併記した。

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号37の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号38の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号39に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-8を得た。また、配列番号39には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-8を併記した。

【 0 1 5 1 】

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号40の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号41の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号42に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-9を得た。また、配列番号42には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-9を併記した。

改変したL鎖V領域のうち、hKM641NLをコードするcDNAは、配列番号17、22、43から46の6本の合成DNAを自動DNA合成機（380A、Applied Biosystems社製）を用いて合成し、それらを用いて実施例1の3項（3）に記載の操作を行うことにより、構築した。その結果、目的の改変が施された配列番号47に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641NLを得た。また、配列番号47には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641NLを併記した。

【 0 1 5 2 】

改変したL鎖V領域のうち、hKM641Lm-69をコードするcDNAは、上記で得られた改変したL鎖V領域のcDNAを有するプラスミドphKM641Lm-6及びphKM641Lm-9を用いて以下の様にして構築した。

まず、プラスミドphKM641Lm-6の3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）及びPstI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約0.30kbのEcoRI-PstI断片を約0.3 μ g回収した。

【 0 1 5 3 】

次に、プラスミドphKM641Lm-9の3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）及びPstI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約3.05kbのEcoRI-PstI断片を約2 μ g回収した。

【 0 1 5 4 】

次に、上記で得られたプラスミドphKM641Lm-6由来のEcoRI-PstI断片0.1 μ gとプラスミドphKM641Lm-9由来のEcoRI-PstI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（Pharmacia社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図9に示したプラスミドphKM641Lm-69を得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の改変が施された配列番号48に示した塩基配列を有することが確認された。また、配列番号48には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-69を併記した。

【 0 1 5 5 】

（ 2 ） 改変L鎖V領域を有する抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターの構築

上記実施例1の5項（1）で得られた各種改変L鎖V領域をコードするcDNAを有するプラスミドと実施例1の4項（2）で得られた抗GD3ハイブリッド抗体の一過性発現ベクターpT641HCDRを用いて各種改変L鎖V領域を有する抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターを以下の様にして構築した。

【 0 1 5 6 】

まず、実施例1の5項（1）で得られた各プラスミドphKM641NL、phKM641Lm-1、phKM641Lm-4、phKM641Lm-6、phKM641Lm-7、phKM641Lm-8、phKM641Lm-9、phKM641Lm-69の各3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT及び100 μ g/mlBSAから成る緩衝液に加え、更に10

単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）及び制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該各反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、それぞれ約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.2 μ g回収した。

【0157】

次に、上記で得られた各種改変L鎖V領域のEcoRI-SplI断片0.1 μ gと実施例1の4項（2）で得られた抗GD3ハイブリッド抗体の一過性発現ベクターpT641HCDR由来のEcoRI-SplI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（Pharmacia社製）を用いて連結した。この様にして得られたそれぞれの組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図10に示した各種改変L鎖V領域を有する抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターpT641HLCDRNL、pT641HLCDRLm-1、pT641HLCDRLm-4、pT641HLCDRLm-6、pT641HLCDRLm-7、pT641HLCDRLm-8、pT641HLCDRLm-9、pT641HLCDRLm-69を得た。

【0158】

（3）改変L鎖V領域を有する抗GD3CDR移植抗体の動物細胞を用いた一過性発現による活性評価

上記実施例1の4項（2）で得られた抗GD3キメラ抗体の一過性発現ベクターpT641、抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターpT641HLCDR及び上記実施例1の5項（2）で得られた改変L鎖V領域を有する抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターpT641HLCDRNL、pT641HLCDRLm-1、pT641HLCDRLm-4、pT641HLCDRLm-6、pT641HLCDRLm-7、pT641HLCDRLm-8、pT641HLCDRLm-9、pT641HLCDRLm-69を用いて各抗体の一過性発現及び活性評価を実施例1の4項（3）に記載の方法に従い、行った。その結果を図11に示した。図11に示した様に、一過性発現ベクターpT641HLCDRLm-6、pT641HLCDRLm-7、pT641HLCDRLm-9、pT641HLCDRLm-69に由来する改変抗GD3CDR移植抗体では、改変前の抗GD3CDR移植抗体に比べ結合活性の上昇が認められ、特に一過性発現ベクターpT641HLCDRLm-69に由来する改変抗GD3CDR移植抗体では、その結合活性は抗GD3キメラ抗体の約80%を示した。一方、これら以外の一過性発現ベクターに由来する改変抗GD3CDR移植抗体では、改変前の抗GD3CDR移植抗体に比べ結合活性の上昇は認められなかった。以上の結果より、実施例1の5

項(1)で同定したL鎖V領域の改変アミノ酸残基のうち、41番目、44番目、83番目および87番目のアミノ酸残基が結合活性の上昇に大きく寄与することが判明した。また、41番目と44番目または83番目と87番目の2種類のアミノ酸残基の同時改変は、活性上昇に相乗的に寄与し、更に41番目、44番目、83番目および87番目の4種類のアミノ酸残基の同時改変も活性上昇に相乗的に寄与することが判明した。実施例1の3項(1)で構築した各種抗体のV領域の三次元構造のコンピューターモデルより、41番目と44番目のアミノ酸残基はH鎖V領域との相互作用に、83番目と87番目のアミノ酸残基はL鎖V領域のCDR3の立体構造にそれぞれ影響を与えることが示唆され、これらのアミノ酸残基をマウス抗体に見られるアミノ酸残基に改変することで、抗体全体の立体構造が適切に保たれ、その結果、結合活性が上昇することが考えられた。本知見は、ヒト型CDR移植抗体の作製においてはH鎖V領域とL鎖V領域の相互作用部位をも考慮する必要があることを示しており、それら相互作用部位の同定には抗体V領域の立体構造からの情報を基にした種々の検討が必要であることを示している。そして、それら相互作用部位に関しては、個々の抗体により異なることは容易に類推され、現段階では一般的な法則を見出すことは困難であり、目的とする個々の抗体に応じた試行錯誤が必要である。

【0159】

6. 抗GD3CDR移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

上記実施例1の5項(3)に記載の結果から、一過性発現ベクターpT641HLCDR Lm-9、pT641HLCDR Lm-69に由来する抗GD3CDR移植抗体は、抗GD3キメラ抗体に比べ、それぞれ約20%、約80%程度のGD3に対する結合活性を有することが示唆された。そこで、それら抗GD3CDR移植抗体の活性を更に詳細に評価するため、以下に示す方法に従い、抗GD3CDR移植抗体を安定に発現する形質転換細胞株を得、形質転換細胞株の培養上清より抗GD3CDR移植抗体の精製を行った。また、比較の為、一過性発現ベクターpT641HLCDRに由来する抗GD3CDR移植抗体の安定発現、精製も同様にして行った。

【0160】

(1) 抗GD3CDR移植抗体の安定発現ベクターの構築

上記実施例1の5項(2)で構築した各種一過性発現ベクターに、以下の様な

方法で薬剤G418に対する耐性遺伝子及びdhfr遺伝子を導入し、安定発現ベクターを構築した。

【0161】

まず、W097/10354に記載のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の3 μ gを10 μ lの20mMトリス-塩酸 (pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT及び100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI (宝酒造社製) 及び制限酵素XhoI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約8.68kbのBamHI-XhoI断片を約1 μ g回収した。

【0162】

次に、上記実施例1の5項(2)で構築した一過性発現ベクターpT641HLCDR_{Lm}-9、pT641HLCDR_{Lm}-69、pT641HLCDRの各3 μ gを10 μ lの20mMトリス-塩酸 (pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT及び100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI (宝酒造社製)、制限酵素XhoI (宝酒造社製) 及び制限酵素StuI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約4.90kbのBamHI-XhoI断片を約1 μ g回収した。

【0163】

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX93由来のBamHI-XhoI断片0.1 μ gと各種一過性発現ベクター由来のBamHI-XhoI断片0.1 μ gをそれぞれ全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。この様にして得られた各組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図12に示した抗GD3CDR移植抗体の安定発現ベクターpKANTEX641HLCDR_{Lm}-9、pKANTEX641HLCDR_{Lm}-69、pKANTEX641HLCDRを得た。

【0164】

(2) 抗GD3CDR移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

上記実施例1の6項(1)で得られた各種抗GD3CDR移植抗体の安定発現ベクターを用いて抗GD3CDR移植抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

各種抗GD3CDR移植抗体発現ベクターの4 μ gを4 $\times 10^6$ 細胞のラットミエローマ細

胞株YB2/0細胞 (ATCC CRL1662) ヘエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]により導入後、40mlのRPMI1640-FBS(10) [牛胎児血清 (FBS) を10%含むRPMI1640培地] に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになる様に添加して1～2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の各種抗GD3CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例1の2項に示すELISA法 [二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(γ)抗体を使用] により測定した。

【 0 1 6 5 】

培養上清中に抗GD3CDR移植抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、dhfr遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、DHFRと表記する) の阻害剤であるメソトレキセート (以下、MTXと表記する: SIGMA社製) を50nM含むRPMI 1640-FBS(10)培地に1～2 $\times 10^5$ 細胞/mlになる様に懸濁し、24ウェルプレート (Greiner社製) に2mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃で1～2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の各種抗GD3CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例1の2項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗GD3CDR移植抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むRPMI1640-FBS(10)培地で増殖可能かつ、抗GD3CDR移植抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、2回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。安定発現ベクターpKANTEX641HLCDR_Lm-9、pKANTEX641HLCDR_Lm-69、pKANTEX641HLCDRを導入して得られたそれぞれの形質転換細胞クローンは、KM8870、KM8871、KM8869と命名し、それぞれの形質転換細胞クローンの抗GD3CDR移植抗体の発現量は約5 μ g/10⁶細胞/24hr、約10 μ g/10⁶細胞/24hr、約30 μ g/10⁶細胞/24hrであった。

【 0 1 6 6 】

(3) 抗GD3CDR移植抗体培養上清からの精製

上記実施例1の6項(2)で得られた各種抗GD3CDR移植抗体を発現する形質転換細胞クローンKM8870、KM8871、KM8869をG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むGIT培地(日本製薬社製)に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/mlとなる様に懸濁し、175cm²フラスコ(Greiner社製)に200mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃で5~7日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A(Bioprocessing社製)カラムを用いて、添付の説明書に従い、各抗GD3CDR移植抗体を精製した。KM8870の培養上清500mlからは抗GD3CDR移植抗体KM8870を約3mg、KM8871の培養上清1600mlからは抗GD3CDR移植抗体KM8871を約25mg、KM8869の培養上清1000mlからは抗GD3CDR移植抗体KM8869を約65mg取得した。得られた各抗GD3CDR移植抗体の約4μgを、公知の方法[ネイチャー(Nature), 27, 680 (1970)]に従って電気泳動し、分子量及び精製度を調べた。その結果を図13に示した。図13に示した様に、精製した各抗GD3CDR移植抗体は、非還元条件下では分子量は約150キロダルトン(以下、Kdと表記する)であり、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のH鎖及びL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量(H鎖: 約49Kd、L鎖: 約24Kd、分子全体: 約146Kd)とほぼ一致し、更に、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合(以下、S-S結合と表記する)が切断され、約50Kdの分子量を持つH鎖と約25Kdの分子量を持つL鎖に分解されるという報告[アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]と一致し、各抗GD3CDR移植抗体が正しい構造の抗体分子として発現されていることが確認された。また、精製した各抗GD3CDR移植抗体のH鎖及びL鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー(470A, Applied Biosystems社製)を用いて自動エドマン分解により解析した結果、それぞれのcDNAの塩基配列から推定されるH鎖及びL鎖のN末端アミノ酸配列と一致することを確認した。

【 0 1 6 7 】

7. 抗GD3CDR移植抗体の活性評価

(1) 抗GD3CDR移植抗体のGD3に対する反応性 (ELISA法)

精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のGD3 (DIA-IATRON社製) に対する反応性を実施例1の2項に示すELISA法により測定した。図14は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるGD3の量を20pmol/ウェルに固定し、添加する抗GD3キメラ抗体KM871及び抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の濃度を変化させて反応性を検討した結果である。図14に示した様に、抗GD3CDR移植抗体のうち、KM8871が最も高い結合活性を示し、それは抗GD3キメラ抗体KM871の約1/2であった。図15は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるGD3の量を変化させ、一定濃度 (10 μ g/ml) の抗GD3キメラ抗体KM871及び抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の反応性を検討した結果である。図15に示した様に、抗GD3CDR移植抗体のうち、KM8871が最も高い結合活性を示し、それは抗GD3キメラ抗体KM871と同等であった。図16は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるガングリオシドの種類を変えて (吸着量: 20pmol/ウェル)、一定濃度 (10 μ g/ml) の抗GD3キメラ抗体KM871及び抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の反応性を検討した結果である。使用したガングリオシドは、GM1、N-アセチルGM2 (Boehringer mannheim社製、以下、AcGM2と表記する)、N-グリコリルGM2 (以下、GcGM2と表記する)、N-アセチルGM3 (以下、AcGM3と表記する)、N-グリコリルGM3 (以下、GcGM3と表記する)、GD1a、GD1b (DIA-IATRON社製)、GD2、GD3 (DIA-IATRON社製)、GQ1b (DIA-IATRON社製)、GT1b (フナコシ社製) の11種類である。なお、GM1とGD1aはウシ脳より、N-グリコリルGM2とN-グリコリルGM3はマウス肝臓より、N-アセチルGM3はイヌ赤血球より、GD2はヒト神経芽細胞腫培養細胞株IMR32 (ATCC CCL127) より、それぞれ公知の方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 263, 10915 (1988)] に準じて精製した。図16に示した様に、抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871は、いずれも抗GD3キメラ抗体KM871と同様にGD3に対して強く、GQ1bに対して弱く結合し、その他のガングリオシドとは結合せず、キメラ抗体KM871の結合特異性を保持していることが示された。

【0168】

(2) 抗GD3CDR移植抗体の人ヒト癌細胞との反応性 (蛍光抗体法)

精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の人ヒト癌細胞との反応性は、以下の様にして測定した。ヒトメラノーマ培養細胞株G-361 (ATCC CRL1424) 及びSK-MEL-28 (ATCC HTB72) のそれぞれ 1×10^6 細胞をPBSに懸濁させ、マイクロチューブ (Treff社製) に取り、遠心分離 (2000rpm、2分間) して細胞を洗浄後、抗GD3キメラ抗体KM871または抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871を $50 \mu\text{l}$ (1%BSA-PBSで $5 \mu\text{g/ml}$ に調整した溶液) 加えて攪拌し、 4°C で1時間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、フルオレッセインイソシアネート (以下、FITCと表記する) で蛍光標識したウサギ抗ヒトIgG (H+L) F(ab')_2 溶液 (和光純薬工業社製、1%BSA-PBSで30倍希釈して使用) を $20 \mu\text{l}$ 加えて攪拌後、 4°C で1時間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、更にPBSに懸濁し、フローサイトメーターEPICS Elite (COULTER社製) を用いて解析を行った。対照として抗体無添加で上記と同様の操作を行い解析した。その結果を図17に示した。図17に示した様に、抗GD3キメラ抗体KM871及び抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871はいずれも両細胞株と反応性を示した。抗GD3CDR移植抗体の中では、KM8871が最も強い反応性を示した。以上の結果は、抗GD3CDR移植抗体がメラノーマを始めとするGD3陽性ヒト腫瘍の診断、治療等に有用であることを示している。

【0169】

(3) 抗GD3CDR移植抗体のin vitro細胞障害活性 (CDC活性)

精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のin vitro細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、CDC活性を測定した。

a. 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10)培地で培養したヒトメラノーマ培養細胞株G-361 (ATCC CRL1424) 及びSK-MEL-28 (ATCC HTB72) のそれぞれ 5×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて 37°C で1時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10)培地で懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、 4°C で30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠

心分離後、RPMI1640-FBS(10)培地を5ml加え、 1×10^6 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

【0170】

b. 補体溶液の調製

3人の健常人の血清を混合し、ヒト補体源とした。使用時には、RPMI1640-FBS(10)培地で15%vol./vol.に希釈して補体溶液として用いた。

c. CDC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルにa.で調製した標的細胞溶液の50 μ lを加え (5×10^4 細胞/ウェル)、次いで抗GD3キメラ抗体KM871或いは抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871を各最終濃度0.05~50 μ g/mlとなる様に加え、室温で30分間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清を除去し、b.で調整したヒト補体溶液を150 μ l添加し、37℃で1時間反応させた。遠心分離後、上清へ遊離した ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液、補体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、補体溶液の代わりに5規定水酸化ナトリウムを添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。CDC活性は、下式により求めた。

【0171】

【数1】

$$\text{CDC 活性(\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

【0172】

その結果を図18に示した。図18に示した様に、抗GD3キメラ抗体KM871及び抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871は、いずれも両細胞株に対してCDC活性を示し、特にヒトメラノーマ培養細胞株G-361に対しては非常に強い細胞障害活性を示すことが明らかとなった。抗GD3CDR移植抗体の中では、KM8871が最も強い細胞障害活性を示し、それは抗GD3キメラ抗体KM871の約1/3であった。

【0173】

(4) 抗GD3CDR移植抗体の in vitro 細胞障害活性 (ADCC活性)

精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

a. 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10)培地で培養したヒトメラノーマ培養細胞株G-361 (ATCC CRL1424) 及びSK-MEL-28 (ATCC HTB72) のそれぞれ 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を1.85MBq当量加えて37℃で1時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10)培地で懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10)培地を5ml加え、 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

b. エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品工業社製) 0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをPolymorphprep (Nycomed Pharma AS社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離 ($1,500 \sim 1,800 \times g$, 30分間) して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10)培地で3回遠心分離 ($1,500 \sim 1,800 \times g$, 5分間) して洗浄後、培地を用いて 5×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

【0174】

c. ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルにa.で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いでb.で調製したエフェクター細胞溶液を $100 \mu\text{l}$ (5×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は50:1となる) 添加した。更に、抗GD3キメラ抗体KM871及び抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871を各最終濃度 $0.05 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ となる様に加え、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求め

た。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに5規定水酸化ナトリウムを添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC活性は下式により求めた。

【0175】

【数2】

$$\text{ADCC 活性(\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

【0176】

その結果を図19に示した。図19に示した様に、抗GD3キメラ抗体KM871及び抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871は、いずれも両細胞株に対して強いADCC活性を示すことが明らかとなった。抗GD3キメラ抗体KM871及び抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の間では、その細胞障害活性に差は認められなかった。

【0177】

以上の結果は、抗GD3キメラ抗体KM871と同様に抗GD3CDR移植抗体がGD3陽性ヒト腫瘍の診断、治療等に有用であることを示している。更に、抗GD3CDR移植抗体では、ヒトにおいてより免疫原性が低下し、その効果がより持続することが期待される。

抗GD3CDR移植抗体のうち、最も高活性を示したKM8871を生産する形質転換細胞クローンKM8871は平成11年7月22日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-6790として寄託されている。

実施例2. 抗GD3CDR移植抗体とヒトサイトカインとの融合蛋白質の作製

抗GD3CDR移植抗体とヒトサイトカインとの融合蛋白質の具体例として、抗GD3CDR移植抗体KM8871とヒトIL-2の融合蛋白質であるKM8871-hIL-2を以下の様にして作製し、その活性評価を行った。

【0178】

1. hC γ 1とhIL-2との融合蛋白質をコードするcDNAの構築

(1) hC γ 1のcDNAの3'末端の約65塩基と成熟型hIL-2の完全長cDNAから成るcDNAを有するプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2の構築

プラスミドpBluescript SK(-) (Stratagene社製) の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの20mMトリス-塩酸 (pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT及び100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI (宝酒造社製) を加えて30℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約2.95kbのApaI-BamHI断片を約2 μ g回収した。

【0179】

次に、配列番号49および配列番号50に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNAを自動DNA合成機 (380A、Applied Biosystems社製) を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 μ gずつを15 μ lの滅菌水に加え、65℃で5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 μ lの10倍緩衝液 [500mMトリス-塩酸 (pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mMDTT) と2 μ lの10mMATPを加え、更に10単位のT4 Polynucleotide Kinase (宝酒造社製) を加えて37℃で30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

【0180】

次に、上記で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のApaI-BamHI断片0.1 μ gとリン酸化合成DNA0.05 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株 (Stratagene社製) を形質転換し、図20に示したプラスミドpBSA-Bを得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia社製) に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia社製) により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

【0181】

次に、上記で得られたプラスミドpBSA-Bの3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH 7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの33mMトリス-酢酸 (pH7.9)、66mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム、0.5mMDTT及び100 μ g/mlBSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SmaI (宝酒造社製) を加えて30℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約3.00kbのEcoRI-SmaI断片を約2 μ g回収した。

【 0 1 8 2 】

次に、成熟型hIL-2の完全長cDNAを含むプラスミドpILL4 [アグリカルチュラル・アンド・バイオリジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.), 51, 1135 (1987)] を鋳型として、以下に示すPCRを行った。プラスミドpILL4の1ngを100 μ lの反応液 [1倍濃度のEx Taq buffer (宝酒造社製)、200 μ M dNTPs、1.0 μ M rev1プライマー (配列番号51)、1.0 μ M fw2プライマー (配列番号52) 及び2.5単位のTaKaRa Ex Taq DNA polymerase (宝酒造社製)] に加え、100 μ lの鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラー (PJ480、PERKIN ELMER社製) にセットし、94℃にて3分間反応後、96℃にて30秒間、55℃にて1分間、72℃にて1分間のサイクルを30サイクル行い、最後に72℃にて7分間の反応を行った。該反応液をエタノール沈殿し、30 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの33mMトリス-酢酸 (pH7.9)、66mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム、0.5mMDTT及び100 μ g/mlBSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SmaI (宝酒造社製) を加えて30℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.41kbのEcoRI-SmaI断片を約1 μ g回収した。

【 0 1 8 3 】

次に、上記で得られたプラスミドpBSA-BのEcoRI-SmaI断片0.1 μ gと成熟型hIL-

2の完全長cDNAのPCR産物のEcoRI-SmaI断片 $0.1\mu\text{g}$ を全量 $10\mu\text{l}$ の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、挿入されたcDNAの塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有する図21に示したプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2を得た。

【0184】

（2）hC γ 1の完全長cDNAと成熟型hIL-2の完全長cDNAから成るcDNAを有するプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2の構築

まず、特開平10-257893に記載のプラスミドpBS Δ hC γ 1の $3\mu\text{g}$ を $10\mu\text{l}$ の10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、 $10\mu\text{l}$ の50mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT及び100mM塩化ナトリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoT22I（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約0.92kbのApaI-EcoT22I断片を約 $1\mu\text{g}$ 回収した。

【0185】

次に、上記実施例2の1項（1）で得られたプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2の $3\mu\text{g}$ を $10\mu\text{l}$ の10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、 $10\mu\text{l}$ の50mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT及び100mM塩化ナトリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoT22I（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約3.40kbのApaI-EcoT22I

断片を約2 μ g回収した。

【 0 1 8 6 】

次に、上記で得られたプラスミドpBS γ 1のApaI-EcoT22I断片0.1 μ gとプラスミドpBS Δ h γ 1-IL-2のApaI-EcoT22I断片0.1 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、図22に示したプラスミドpBS γ 1-IL-2を得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、挿入されたcDNAの塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有するプラスミドが得られたことを確認した。

【 0 1 8 7 】

2. KM8871-hIL-2の動物細胞を用いた安定発現

（1）KM8871-hIL-2の安定発現ベクターの構築

上記実施例1の6項（1）で得られた抗GD3CDR移植抗体KM8871の安定発現ベクターpKANTEX641HLCDR μ -69と上記実施例2の1項（2）で得られたh γ 1とhIL-2との融合蛋白質をコードするcDNAを有するプラスミドpBS γ 1-IL-2を用いてKM8871-hIL-2の安定発現ベクターを以下の様にして構築した。

【 0 1 8 8 】

実施例1の6項（1）で得られたプラスミドpKANTEX641HLCDR μ -69の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの20mMトリス-塩酸（pH8.5）、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT及び100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI（宝酒造社製）を加えて30℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約12.57kbのApaI-BamHI断片を約2 μ g回収した。

【 0 1 8 9 】

次に、実施例 2 の 1 項 (2) で得られたプラスミド pBS γ 1-IL-2 の 3 μ g を 10 μ l の 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム及び 1mM DTT から成る緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ l の 20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT 及び 100mM 塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 BamHI (宝酒造社製) を加えて 30°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い、約 1.45kb の ApaI-BamHI 断片を約 2 μ g 回収した。

【 0 1 9 0 】

次に、上記で得られたプラスミド pKANTEX641HLC Δ RLm-69 由来の ApaI-BamHI 断片 0.1 μ g とプラスミド pBS γ 1-IL-2 由来の ApaI-BamHI 断片 0.1 μ g を全量 10 μ l の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、図 2 3 に示した KM8871-hIL-2 の安定発現ベクター pKANTEX8871-hIL2 を得た。得られたプラスミドの 10 μ g を用い、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia 社製) に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia 社製) により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の DNA がクロニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

【 0 1 9 1 】

(2) KM8871-hIL-2 の動物細胞での発現

上記実施例 2 の 2 項 (1) で得られた KM8871-hIL-2 の安定発現ベクター pKANTEX8871-hIL2 の 4 μ g を用いて実施例 1 の 6 項 (2) に記載の方法に従い、YB2/0 細胞 (ATCC CRL1581) を形質転換し、最終的に G418 (0.5mg/ml) 及び MTX (200nM) による選択を行い、約 4 μ g / 10⁶ 細胞/24 時間の発現量を示す形質転換細胞クローン KM8871hIL2 を得た。なお、KM8871hIL2 は平成 10 年 7 月 22 日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に FERM BP-6791 として寄託されている。

【 0 1 9 2 】

(3) KM8871-hIL-2の培養上清からの精製

上記実施例2の2項(2)で得られたKM8871-hIL-2を発現する形質転換細胞クローンKM8871hIL2を実施例1の2項(4)に記載の方法に従い、培養し、培養上清約3Lより約10.0mgの精製KM8871-hIL-2を得た。図24には、精製したKM8871-hIL-2のSDS-PAGEの結果を示した。図24に示した様に、精製したKM8871-hIL-2は、非還元条件下では分子量は約180Kdであり、還元条件下では約65Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、KM8871-hIL-2のH鎖とhIL-2及びL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量(H鎖とhIL-2: 約64Kd、L鎖: 約24Kd、分子全体: 約176Kd) とほぼ一致し、抗体分子としての構造は、hIL-2の融合後においても保たれていることが確認された。

【 0 1 9 3 】

3. KM8871-hIL-2の活性評価

(1) KM8871-hIL-2のGD3に対する反応性(ELISA法)

精製したKM8871-hIL-2のGD3(DIA-IATRON社製)に対する反応性を実施例1の2項に記載の方法に従い、測定した。但し、二次抗体溶液として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体(American Qualex社製、1%BSA-PBSで3000倍に希釈して使用)を用いた。第25図は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるGD3の量を20pmol/ウェルに固定し、添加する抗GD3CDR移植抗体KM8871及びKM8871-hIL-2の濃度を变化させて反応性を検討した結果である。第25図に示した様に、KM8871-hIL-2は抗GD3CDR移植抗体KM8871と同等以上のGD3に対する結合活性を有していることが示された。第26図は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるガングリオシドの種類を変えて(吸着量: 20pmol/ウェル)、一定濃度(10 μ g/ml)の抗GD3CDR移植抗体KM8871及びKM8871-hIL-2の反応性を検討した結果である。第26図に示した様に、KM8871-hIL-2は抗GD3CDR移植抗体KM8871と同様にGD3に対して強く結合することが示されたが、KM8871-hIL-2は更にGD2に対しても強く結合することが確認された。KM8871-hIL-2のGD2との交差反応性の原因としては、hIL-2とGD2の結合の可能性の他、hIL-2の融合による抗体V領域の立体構造の変化による結合特異性の変化の可能性、hIL-2の融合による抗体C領域の立体構造の変化による二次抗体の反応性の変化の可能性等が考えられる。

【 0 1 9 4 】

(2) KM8871-hIL-2の細胞表面のGD3に対する反応性（蛍光抗体法）

実施例 1 の 7 項 (2) に記載の方法により、精製したKM8871-hIL-2のヒト癌細胞との反応性を測定した。その結果を図27に示す。図27に示したように、KM871-hIL-2はヒトメラノーマ培養細胞株G361に対し、抗GD3CDR移植抗体KM8871とほぼ同等の強い反応性を示した。この結果は、KM8871-hIL-2がメラノーマを始めとするGD3陽性ヒト腫瘍の治療等に有用であることを示している。

【 0 1 9 5 】

(3) KM8871-hIL-2のhIL-2活性の評価

精製したKM8871-hIL-2のhIL-2としての活性を以下に示す方法に従い、測定した。hIL-2に対して濃度依存的な増殖を示すマウスT細胞株CTLL-2 (ATCC TIB214) を 2×10^5 細胞/mlの濃度でRPMI1640-FBS(10)培地に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート（住友ベークライト社製）に $50 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注した。各ウェルにhIL-2 (R&D SYSTEMS社製) 或いは精製したKM8871-hIL-2をRPMI1640-FBS(10)培地で各種濃度に希釈した溶液の $50 \mu\text{l}$ を加え、5%CO₂インキュベーター内で37℃で30時間培養した。培養後、Cell Counting Kit（同仁化学研究所製）を用いて使用説明書に従い、生細胞数を測定した。その結果を図28に示した。図28に示した様に、KM8871-hIL-2はhIL-2と同程度のCTLL-2細胞の増殖支持活性を示した。以上の結果は、KM8871-hIL-2のhIL-2としての活性は抗GD3CDR移植抗体KM8871との融合後においても保たれていることを示している。

【 0 1 9 6 】

(4) KM8871-hIL-2によるヒトエフェクター細胞の活性化と細胞障害活性の増強

KM8871-hIL-2のhIL-2部分によるヒトエフェクター細胞の活性化と、それに伴う細胞障害活性の増強を *in vitro* で評価するため、以下に示す方法に従い、細胞障害活性を測定した。

a. 標的細胞溶液の調製

実施例 1 の 7 項 (4) の a. に記載の方法に従い、ヒトメラノーマ培養細胞株G361を 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

b. ヒトエフェクター細胞溶液の調製

実施例1の7項(4)のb.に記載の方法に従い、健常人静脈血より単核球を分離後 5×10^6 細胞/mlの各密度に再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

【0197】

c. ヒトエフェクター細胞の活性化

96ウェルU字底プレート(Falcon社製)の各ウェルにb.で調製したエフェクター細胞溶液 $100 \mu\text{l}$ を分注した(5×10^4 細胞/ウェル)。さらに抗GD3CDR移植抗体KM8871或いはKM8871-hIL-2を各最終濃度 11.1 nM となる様に $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ インキュベーター内で24時間反応させた。

d. 細胞障害活性の測定

c.で用意したプレートの各ウェルにa.で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 細胞/ウェル)を添加した。この時、エフェクター細胞と標的細胞の比は5:1となる。 37°C で4時間反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。細胞障害活性は下式により求めた。

【0198】

【数3】

$$\text{ADDC 活性}(\%) = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

【0199】

その結果を図29に示した。図29に示した様に、KM8871-hIL-2は抗GD3CDR移植抗体KM8871よりも強い細胞障害活性を誘導することが明らかとなった。本結果は、KM8871-hIL-2を用いてヒトエフェクター細胞を活性化でき、細胞障害活性が増強されることを示したものであり、ヒトへの臨床応用においても同様の効果が期待できることを示唆する結果である。

【0200】

実施例3. 抗GD3キメラ抗体とヒトサイトカインとの融合蛋白質の作製

抗GD3キメラ抗体とヒトサイトカインとの融合蛋白質の具体例として、抗GD3キメラ抗体KM871とヒトIL-2の融合蛋白質であるKM871-hIL-2を以下の様にして作製し、その活性評価を行った。

1. KM871-hIL-2の動物細胞を用いた安定発現

(1) KM871-hIL-2の安定発現ベクターの構築

抗GD3キメラ抗体KM871の安定発現ベクターpKANTEX641（特開平5-304989）と実施例2の1項(2)で得られたhC γ 1とhIL-2との融合蛋白質をコードするcDNAを有するプラスミドpBShC γ 1-IL-2を用いてKM871-hIL-2の安定発現ベクターを以下の様にして構築した。

【0201】

実施例1の6項(1)で得られたプラスミドpKANTEX641の3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム及び1mMDTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの20mM トリス-塩酸（pH8.5）、10mM塩化マグネシウム、1mMDTT及び100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI（宝酒造社製）を加えて30℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約12.57kbのApaI-BamHI断片を約2 μ g回収した。

【0202】

次に、実施例2の1項(2)で得られたプラスミドpBShC γ 1-IL-2の3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム及び1mMDTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの20mM トリス-塩酸（pH8.5）、10mM塩化マグネシウム、1mMDTT及び100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI（宝酒造社製）を加えて30℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約1.45kbのApaI-BamHI断片を約2 μ g回

収した。

【0203】

次に、上記で得られたプラスミドpKANTE_X641由来のApaI-BamHI断片0.1 μ gとプラスミドpBShC γ 1-IL-2由来のApaI-BamHI断片0.1 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、図30に示したKM871-hIL-2の安定発現ベクターpKANTE_X871-hIL2を得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

【0204】

（2）KM871-hIL-2の動物細胞での発現

上記実施例3の1項（1）で得られたKM871-hIL-2の安定発現ベクターpKANTE_X871-hIL2の4 μ gを用いて実施例1の6項（2）に記載の方法に従い、YB2/0細胞（ATCC CRL1581）を形質転換し、最終的にG418（0.5mg/ml）及びMTX（200nM）による選択を行い、約4 μ g/10⁶細胞/24hrの発現量を示す形質転換細胞クローンKM871hIL2を得た。なお、KM871hIL2は平成11年10月19日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-6918として寄託されている。

【0205】

（3）KM871-hIL-2の培養上清からの精製

上記実施例3の1項（2）で得られたKM871-hIL-2を発現する形質転換細胞クローンKM871hIL2を実施例1の2項（4）に記載の方法に従い、培養し、培養上清約3Lより約10.0mgの精製KM871-hIL-2を得た。図31には、精製したKM871-hIL-2のSDS-PAGEの結果を示した。図31に示した様に、精製したKM871-hIL-2は、非還元条件下では分子量は約180Kdであり、還元条件下では約65Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、KM871-hIL-2のH鎖とhIL-2及びL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量（H鎖とhIL-2：約64Kd、L鎖：約24Kd、分子

全体：約176Kd）とほぼ一致し、抗体分子としての構造はhIL-2の融合後においても保たれていることが確認された。

【 0 2 0 6 】

2. KM871-hIL-2のin vitro活性評価

(1) KM871-hIL-2のGD3に対する反応性 (ELISA法)

精製したKM871-hIL-2のGD3 (DIA-IATRON社製) に対する反応性を実施例 1 の 2 項に記載の方法に従い、測定した。但し、二次抗体溶液として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体 (American Qualex社製、1%BSA-PBSで3000倍に希釈して使用) を用いた。図32は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるGD3の量を20pmol/ウェルに固定し、添加する抗GD3キメラ抗体KM871及びKM871-hIL-2の濃度を変化させて反応性を検討した結果である。図32に示した様に、KM871-hIL-2は抗GD3キメラ抗体KM871と同等以上のGD3に対する結合活性を有していることが示された。図33は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるガングリオシドの種類を変えて (吸着量：20pmol/ウェル)、一定濃度 (6.7nM) の抗GD3キメラ抗体KM871及びKM871-hIL-2の反応性を検討した結果である。図33に示した様に、KM871-hIL-2は抗GD3キメラ抗体KM871と同様にGD3のみに対して強く結合することが示され、hIL-2の付加はKM871の抗原特異性に大きな影響を与えないことが示された。

【 0 2 0 7 】

(2) KM871-hIL-2の細胞表面のGD3に対する反応性 (蛍光抗体法)

実施例 1 の 7 項 (2) に記載の方法により、精製したKM871-hIL-2のヒト癌細胞との反応性を測定した。

その結果を図34に示す。図34に示したように、KM871-hIL-2はヒトメラノーマ培養細胞株G361及びSK-MEL-28に対し、抗GD3キメラ抗体KM871とほぼ同等の強い反応性を示した。この結果は、KM871-hIL-2がメラノーマを始めとするGD3陽性ヒト腫瘍の治療等に有用であることを示している。

【 0 2 0 8 】

(3) KM871-hIL-2のhIL-2活性の評価

精製したKM871-hIL-2のhIL-2としての活性を実施例 2 の3項 (2) に従い測定

し、その結果を図35に示した。図35に示した様に、KM871-hIL-2はhIL-2と同程度のCTLL-2細胞の増殖支持活性を示した。以上の結果は、KM871-hIL-2のhIL-2としての活性は抗GD3キメラ抗体KM871との融合後においても保たれていることを示している。

【0209】

(4) KM871-hIL-2によるヒトリンパ球の活性化

KM871-hIL-2のIL-2部分によるヒトリンパ球の活性化と、それに伴う細胞障害活性の増強を*in vitro*で評価するため、実施例1の7項(4)に記載した方法の細部に変更を加えた以下に示す方法に従い、細胞障害活性を測定した。

a. 標的細胞溶液の調製

実施例1の7項(4)のa.に記載の方法に従い、ヒトメラノーマ培養細胞株G361を 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

b. エフェクター細胞溶液の調製

実施例1の7項(4)のb.に記載の方法に従い、健常人静脈血より単核球を分離後 1×10^7 細胞/mlの各密度に再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

c. リンパ球の活性化

96ウェルU字底プレート(Falcon社製)の各ウェルにb.で調製したエフェクター細胞溶液 $50 \mu\text{l}$ を分注した(5×10^4 細胞/ウェル)。さらに抗GD3キメラ抗体KM871もしくはKM871-hIL-2を添加したRPMI1640-FBS(10)培地を各最終濃度1nMとなる様に $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し(KM871の分子量は150Kd、KM871-hIL-2の分子量は180Kdとして計算)、37℃、5%炭酸ガス存在下で72時間静置した。

【0210】

d. 細胞障害活性の測定

c.で用意したプレートの各ウェルにa.で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 細胞/ウェル)を添加した。このときエフェクター細胞と標的細胞の比は5:1となる。さらに抗GD3キメラ抗体KM871もしくはKM871-hIL-2を添加したRPMI1640-FBS(10)培地を各最終濃度1nMを保つように $50 \mu\text{l}$ ずつ加えて37℃で4時間反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量をγ-カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と

同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。細胞障害活性は実施例1の7項(4)のb.に記載した方法により求め、その結果を図36に示した。図36に示した様に、KM871-hIL-2はKM871よりも強い細胞障害活性を誘導することが明らかとなった。この結果から、KM871-hIL-2はGD3陽性ヒト腫瘍の臨床応用においても、hIL-2部分を介したヒトリンパ球の活性化によって、KM871の持つ治療効果をさらに増強することが期待される。

【 0 2 1 1 】

3.KM871-hIL-2のin vivo活性評価

(1) マウス同系移植モデル用B16細胞のGD3合成酵素遺伝子導入形質転換株の作製

a.GD3合成酵素遺伝子の安定発現ベクターの構築

GD3合成酵素遺伝子の動物細胞発現用ベクターpAMo-GD3 (W094/23020) の $3\mu\text{g}$ を $10\mu\text{l}$ の 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、 50mM 塩化ナトリウム、 10mM 塩化マグネシウム及び 1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製)を加えて 37°C で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、 $10\mu\text{l}$ の 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、 100mM 塩化ナトリウム、 10mM 塩化マグネシウム、 1mM DTT、 $100\mu\text{g/ml}$ BSA及び 0.01% トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて 37°C で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、制限酵素消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約 2.1kb の平滑末端HindIII-NotI断片を約 $2\mu\text{g}$ 回収した。

次に、抗GD3キメラ抗体発現ベクターpKANTEX641の $3\mu\text{g}$ を $10\mu\text{l}$ の 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、 100mM 塩化ナトリウム、 10mM 塩化マグネシウム及び 1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加えて 37°C で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、制限酵素消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた。該反応

液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム及び1mM DTTから成る緩衝液とし、更に10単位の制限酵素NruI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、及び10mM塩化マグネシウムから成る緩衝液とし、更に10単位の5'末端脱リン酸化酵素Calf intestine由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させて5'末端を脱リン酸化した。該反応液をフェノール処理後アガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick

Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約9.4kbの平滑末端・脱リン酸化EcoRI- NruI断片を約2 μ g回収した。

【 0 2 1 2 】

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX641由来のEcoRI- NruI断片0.1 μ gとプラスミドpAMo-GD3由来のHindIII- NotI断片0.1 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、図37に示したGD3合成酵素の安定発現ベクターpKANTEXGD3を得た。

【 0 2 1 3 】

b. GD3合成酵素発現ベクターのB16細胞への導入

上記実施例3の4項(1)のa.で得られたGD3合成酵素遺伝子の安定発現ベクターpKANTEXGD3の4 μ gを用いて実施例1の6項(2)に記載の方法に従い、B16・F10細胞(ATCC CRL1581)を形質転換し、最終的にG418 (0.5mg/ml) による選択を行い、形質転換細胞クローンB16・8-3およびB16・29-10を得た。

【 0 2 1 4 】

c. 蛍光抗体法によるGD3発現株のGD3発現量の解析

実施例3の4項(1)のb. で得られたGD3合成酵素遺伝子トランスフェクタントB16・8-3及びB16・29-10、さらに親株のB16・F10細胞のそれぞれ 1×10^6 細胞をPBSに懸濁させ、マイクロチューブ (Treff社製) に取り、遠心分離 (2000rpm、2分間) して細胞を洗浄後、抗GD3キメラ抗体KM871を50 μ l (1%BSA-PBSで5 μ g/mlに調整した溶液、陰性対照は1%BSA-PBSのみ) 加えて攪拌し、4℃で1時間反応させ

た。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、ビオチン標識したヤギ抗ヒトIgG (H+L) 溶液 (VECTOR社製、1%BSA-PBSで400倍希釈して使用) を100 μ l加えて攪拌し、4℃で1時間反応させた。PBSで3回遠心分離して洗浄した後、ストレプトアビジン標識したCy5色素溶液 (GIBCO社製Streptavidin-RED670、1%BSA-PBSで100倍希釈して使用) を100 μ l加えて攪拌し、4℃で30分間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、更にPBSに懸濁し、フローサイトメーターEPICS Elite (COULTER社製) を用いて解析を行った。その結果を図38に示した。図38に示した様に、抗GD3キメラ抗体KM871はB16・8-3及びB16・29-10のみに反応し、親株のB16・F10細胞には反応性を示さなかった。以上の結果は、B16・8-3及びB16・29-10の両トランスフェクタントは表面にGD3を発現し、B16細胞の由来であるC57 BL/6マウスに移植することによりKM871-hIL-2の in vivo 抗腫瘍効果測定用のモデルとなりうることを示している。

【 0 2 1 5 】

(2) KM871-hIL-2の in vivo 抗腫瘍効果の測定

a. GD3発現形質転換株B16・29-10を移植したマウスによる評価

実施例3の4項(1)のb. で得られたGD3発現B16細胞B16・29-10を 2.5×10^6 個/mlでPBSに懸濁し、C57 BL/6 Cr slcマウス (雌、8週齢、日本SLC社製) の尾静脈より100 μ l注入した。さらに腫瘍移植当日より1日1回、5日間連続でKM871を50または200 μ g/日、あるいはKM871-hIL-2を20または50 μ g/日で尾静脈投与した。腫瘍移植後15日目に肺を摘出し、表面の黒色の転移巣を肉眼で計数した結果を第3表及び図39に示す。

【 0 2 1 6 】

【表3】

第 3 表

グループ		肺表面の転移巣の数 (個)	平均値
抗体非投与群		147/136/106/72/70	106.2
KM871-hIL-2	20 μ g	20/15/11/2/2/1	8.5
KM871-hIL-2	50 μ g	15/12/5/2/0/0	5.7
KM871	50 μ g	185/114/86/77	115.5
KM871	200 μ g	113/87/86/86/77/55	84

【0217】

第3表及び図39に示したように、クローンB16・29-10を用いたモデルマウスに対し、KM871-hIL-2はKM871よりも明らかに強い抗転移効果を示した。

b. GD3発現形質転換株B16・8-3を移植したマウスによる評価

実施例3の4項(1)のb. で得られたGD3発現B16細胞B16・8-3を用い、上記実施例3の4項(2)のa. に記載の方法に従いKM871-hIL-2の抗転移効果を測定した。用量はKM871、KM871-hIL-2ともに40または100 μ g/日である。その結果を第4表及び図40に示す。

【0218】

【表4】

第 4 表			
グループ		肺表面の転移巣の数 (個)	平均値
抗体非投与群		170/128/113/66/42/16/0	76.4
KM871-hIL-2	40 μ g	1/0/0	0.3
KM871-hIL-2	100 μ g	3/0/0	1
KM871	40 μ g	128/70/30	76
KM871	100 μ g	26/20/17	21

【0219】

第4表及び図40に示したように、クローンB16・8-3を用いたモデルマウスに対しても、KM871-hIL-2はKM871よりもさらに強い抗転移効果を示した。

【0220】

c. KM871とhIL-2の併用投与との比較

実施例3の4項(1)のb. で得られたGD3発現B16細胞B16・29-10を 2.5×10^6 個/mlでPBSに懸濁し、C57 BL/6 Cr slcマウス(雌、8週齢、日本SLC)の尾静脈より100 μ l注入した。さらに腫瘍移植当日より1日1回、5日間連続でKM871-hIL-2を6 μ gまたは18 μ g/日で尾静脈投与した。さらに別の群に対して、投与したKM871-hIL-2に相当する量のKM871とhIL-2(Peprotech社製)の混合溶液(KM871 5 μ gとhIL-2 1 μ g、またはKM871 15 μ gとhIL-2 3 μ g)を腫瘍移植当日より1日1回、5日間連続で尾静脈投与した。腫瘍移植後15日目に肺を摘出し、表面の黒色の転移巣を肉眼で計数した結果を第5表及び図41に示す。

【 0 2 2 1 】

【表 5】

第 5 表		
グループ	肺表面の転移巣の数 (個)	平均値
抗体非投与群	163/132/97/95/88/57	105.3
KM871-hIL-2 6 μ g	26/26/17/12/8	17.8
KM871-hIL-2 18 μ g	43/34/28/13/2	24
KM871 + hIL-2 5 μ g + 1 μ g	215/117/97/85/56	114
KM871 + hIL-2 15 μ g + 3 μ g	92/61/48/46/42	57.8

【 0 2 2 2 】

第 5 表及び図 41 に示したように、クローン B16-29-10 を用いたモデルマウスに対し、KM871-hIL-2 は等量の KM871 と hIL-2 の併用投与よりもさらに強い抗転移効果を示した。このことは KM871-hIL-2 の示す in vivo 抗腫瘍効果は、単に KM871 と hIL-2 の相加的なものではなく、腫瘍に集積した KM871-hIL-2 の hIL-2 部分が周辺のリンパ球を活性化し、効率的に抗腫瘍免疫を誘導したことを示しており、KM871-hIL-2 は従来の hIL-2 単独あるいは抗体との併用投与よりもさらに治療効果が高く、しかも hIL-2 に由来する副作用を低減した治療剤となりうる可能性を示している。

【 0 2 2 3 】

【発明の効果】

本発明により、GD3 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片およびガングリオシド GD3 に対する抗体またはその抗体断片の誘導体が提供される。

【 0 2 2 4 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Humanized anti-GD3 antibody and it's cytokine conjugate

<130>

<140>

<141>

<160> 56

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 138

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Leu Val Phe Lys Gly

-19 -15 -10 -5

Val Gln Cys Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Lys

-1 1 5 10

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe

15 20 25

Ser His Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu

30 35 40 45

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser

50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

65 70 75

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met

80 85 90

Tyr Phe Cys Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp

95 100 105

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

110 115

【0225】

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
-20 -15 -10 -5

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro
-1 1 5 10

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp
15 20 25

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
30 35 40

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser
45 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser
80 85 90

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

95

100

105

【 0 2 2 6 】

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

His Tyr Ala Met Ser

1

5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly

1

5

10

15

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser

1

5

10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 8

His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

【 0 2 2 7 】

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser

115

【0228】

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

【 0 2 2 9 】

<210> 11

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

caggaaacag ctatgacgcg gccgccacca tggagtttgg gtcagctgg ctttttcttg 60
tccttgtttt caaaggtgtt cagtgtgagg tgcag 95

<210> 12

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 12

aaagcgaatc cagaggctgc acaggagact ctacagagacc cccccggctg tacaaagtct 60
ccccagact ccaccagctg cacctcacac tgaacac 97

<210> 13

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 13

gcagcctctg gattcgcttt cagtcattat gccatgtctt ggggccgcca ggctccaggg 60
aaggggctgg agtgggtggc ttatattagt agtgggtg 98

<210> 14

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 14

gatacagcgt gttcttggag ttatctctgg agatggtgaa tctgcccttt acactgtctg 60
aatagtaggt gccactacca ccactactaa tataagc 97

【0230】

<210> 15

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 15

ctccaagaac acgctgtatc tgcaaattgcg cagcctgaga gctgaggact cggctgtgta 60
tttctgtaca agagttaaac tgggaacctt ctactttg 98

<210> 16

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 16

gttttcccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgagc agggttccct 60
ggccccagga gtcaaagtag taggttccca gt 92

<210> 17

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 17

caggaaacag ctatgacgaa ttccaccatg atgtcctctg ctcagttcct tggctctcctg 60
ttgtctgtgt ttcaaggtag cagatgtgac atcc 94

<210> 18

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 18

gcactacaag tgatggtgac tctgtctcct acagatgcag acaggaggga tggagactgg 60
gtcatctgga tgtcacatct ggtacct 87

【 0 2 3 1 】

<210> 19

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 19

gtcaccatca cttgtagtgc aagtcaggac attagtaatt atttaaactg gtatcagcag 60
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgat 89

<210> 20

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 20

taatctgtcc cagatccacc gccgctgaac cttgatggga cccccgagtg taaatttgat 60
gagtaaaaga tcaggagctt aggggcttt 89

<210> 21

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 21

ggtggatctg ggacagatta tactctcacc atcagcagcc tgcagcctga agattttgca 60
acttattact gtcatcagta tagtaagctt cc 92

<210> 22

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 22

gttttcccag tcacgaccgt acgtttaatc tctaccttgg tcccctggcc gaacgtccac 60
ggaagcttac tatactgatg 80

【 0 2 3 2 】

<210> 23

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 23

agcttccatg gacgttcggt ggaggcacca agctggaaat caaac 45

<210> 24

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 24

gtacgtttga ttccagctt ggtgcctcca ccgaacgtcc atgga 45

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 25

gatgcaggca gggaggatgc agtctgggt 29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 26

accagactg catcctccct gcctgcatc

29

【 0 2 3 3 】

<210> 27

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 27

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag act gca tcc tcc ctg cct 96

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro

-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cat cag tat agt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser

80 85 90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

95 100 105

【0234】

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 28

actgatgaca gaaataagtt gcaaaa

26

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 29

ttttgcaact tatttctgtc atcagt

26

<210> 30

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 30

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp

15

20

25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30

35

40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser

45

50

55

60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat ttc tgt cat cag tat agt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser

80

85

90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

95

100

105

【 0 2 3 5 】

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 31

ggagcttaac ggctttgtct ggtttctg 28

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 32

cagaaaccag acaaagccgt taagctcc 28

【 0 2 3 6 】

<210> 33

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 33

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20	-15	-10	-5	
ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct				96
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser				
	-1 1	5	10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac				144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp				
	15	20	25	
att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca gac aaa gcc gtt				192
Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Lys Ala Val				
	30	35	40	
aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca				240
Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser				
	45	50	55	60
agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc				288
Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser				
	65	70	75	
agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cat cag tat agt				336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser				
	80	85	90	
aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt				384
Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg				
	95	100	105	

【 0 2 3 7 】

<210> 34

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 34

gttgcgatat cttcaggctg cagattgctg atggtgagac tataatct 48

<210> 35

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 35

agattatagt ctcacatca gcaatctgca gcctgaagat atcgcaac 48

<210> 36

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 36

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20 -15 -10 -5

ggg acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat agt ctc acc atc agc 288

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

65 70 75

aat ctg cag cct gaa gat atc gca act tat tac tgt cat cag tat agt 336

Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser

80

85

90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

95

100

105

【 0 2 3 8 】

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 37

ttcaggctgc agattgctga tgggtg

25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 38

caccatcagc aatctgcagc ctgaa

25

<210> 39

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 39

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

aat ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cat cag tat agt 336

Asn Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser

80

85

90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

95

100

105

【 0 2 3 9 】

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 40

gacagaaata agttgcgata tcttcaggct

30

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 41

agcctgaaga tatcgcaact tatttctgtc

30

<210> 42

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 42

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20

-15

-10

-5

ggg acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

-1 1

5

10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp

15

20

25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30

35

40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser

45

50

55

60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

agc ctg cag cct gaa gat atc gca act tat ttc tgt cat cag tat agt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser

80

85

90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

95

100

105

【 0 2 4 0 】

<210> 43

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 43

gcactacaag tgatggtgac tctgtctcct acagatgcag gcagggagga tgcagactgg 60

gtcatctgga tgcacatct ggtacct

87

<210> 44

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 44

gtcaccatca cttgtagtgc aagtcaggac attagtaatt atttaaactg gtatcagcag 60

aaaccaggga aagccgttaa gctcctgat

89

<210> 45

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 45

taatctgtcc cagatccacc gccgctgaac cttgatggga ccccgagtg taaatttgat 60

gagtaaaaga tcaggagctt aacggcttt

89

<210> 46

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 46

ggtaggatctg ggacagatta tactctcacc atcagcagcc tgcagcctga agattttgca 60
acttattttct gtcacagta tagtaagctt cc 92

【 0 2 4 1 】

<210> 47

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 47

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
-20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct gca tcc tcc ctg cct 96
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ala Ser Ser Leu Pro
-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp
15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc gtt 192

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val

30

35

40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser

45

50

55

60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat ttc tgt cat cag tat agt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser

80

85

90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

95

100

105

【0242】

<210> 48

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 48

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
-20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp
15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca gac aaa gcc gtt 192
Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Lys Ala Val
30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240
Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser
45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288
Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75

agc ctg cag cct gaa gat atc gca act tat ttc tgt cat cag tat agt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser

80

85

90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

95

100

105

【 0 2 4 3 】

<210> 49

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 49

catgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctcccggggg 60

agaattcatt gatcag 76

<210> 50

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 50

gatcctgata aatgaattct cccccgggag acaggagag gctcttctgc gtgtagtggt 60

tgtgcagagc ctcatgcatg gggcc 85

<210> 51

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 51

gtctcccggg aaagcaccta ctagtagttc tacaaag

37

<210> 52

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 52

ccctgatcaa tgaattcaag tcagtgttga gatgatgc

38

【 0 2 4 4 】

<210> 53

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 53

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Gln Pro Gly Gly

15

30

45

60

80

95

110

125

140

160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 450 455 460

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser

Ile Ile Ser Thr Leu Thr

【 0 2 4 5 】

<210> 54

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 55

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

【 0 2 4 6 】

<210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 57

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 57

Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr

20

25

30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys

85

90

95

Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115

120

125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130

135

140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145

150

155

160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165

170

175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
450 455 460

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
465 470 475 480

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro

485

490

495

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu

500

505

510

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His

515

520

525

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu

530

535

540

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr

545

550

555

560

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser

565

570

575

Ile Ile Ser Thr Leu Thr

580

【図面の簡単な説明】

【図1】 はプラスミドphKM641Hの造成工程を示した図である。

【図2】 はプラスミドphKM641Lの造成工程を示した図である。

【図3】 はプラスミドpT796H641Lの造成工程を示した図である。

【図4】 はプラスミドpBS641Hの造成工程を示した図である。

【図5】 はプラスミドpT641の造成工程を示した図である。

【図6】 はプラスミドpT641HCDRの造成工程を示した図である。

【図7】 はプラスミドpT641LCDR及びpT641HLCDRの造成工程を示した図である。

【図8】 はプラスミドpT641、pT641HCDR、pT641LCDR、pT641HLCDRを用いた抗GD3

キメラ抗体及び抗GD3CDR移植抗体の一過性発現による活性評価を示した図である。縦軸に発現ベクター名、横軸に抗GD3キメラ抗体の活性を100とした時の相対活性値 (%) をそれぞれ示す。

【図9】はプラスミドp_hKM641L_m-69の造成工程を示した図である。

【図10】はプラスミドpT641HLC_{DR}NL、pT641HLC_{DR}L_m-1、pT641HLC_{DR}L_m-4、pT641HLC_{DR}L_m-6、pT641HLC_{DR}L_m-7、pT641HLC_{DR}L_m-8、pT641HLC_{DR}L_m-9、pT641HLC_{DR}L_m-69の造成工程を示した図である。

【図11】はプラスミドpT641、pT641HLC_{DR}、pT641HLC_{DR}NL、pT641HLC_{DR}L_m-1、pT641HLC_{DR}L_m-4、pT641HLC_{DR}L_m-6、pT641HLC_{DR}L_m-7、pT641HLC_{DR}L_m-8、pT641HLC_{DR}L_m-9、pT641HLC_{DR}L_m-69を用いた抗GD3キメラ抗体及び抗GD3CDR移植抗体の一過性発現による活性評価を示した図である。縦軸に発現ベクター名、横軸に抗GD3キメラ抗体の活性を100とした時の相対活性値 (%) をそれぞれ示す。

【図12】はプラスミドpK_{AN}TEX641HLC_{DR}、pK_{AN}TEX641HLC_{DR}L_m-9、pK_{AN}TEX641HLC_{DR}L_m-69の造成工程を示した図である。

【図13】は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のSDS-PAGE (4~15%グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がKM8869、3がKM8870、4がKM8871、5が低分子量マーカー、6がKM8869、7がKM8870、8がKM8871の泳動パターンをそれぞれ示す。

【図14】は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のGD3との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がKM871、●がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の活性をそれぞれ示す。

【図15】は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のGD3との結合活性をプレートに吸着させるGD3量を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸はプレートに吸着させたGD3量をそれぞれ示す。○がKM871、●がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の活性をそれぞれ示す。

【図16】は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、

KM8870、KM8871の各種ガングリオシドとの反応性を示した図である。縦軸にガングリオシドの種類、横軸に結合活性をそれぞれ示す。AcGM2はN-アセチルGM2、GcGM2はN-グリコリルGM2、AcGM3はN-アセチルGM3、GcGM3はN-グリコリルGM3を示す。□がKM871、□がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の反応性をそれぞれ示す。

【図17】は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のヒトメラノーマ細胞株G-361及びSK-MEL-28との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。各図は下段より、コントロール、KM871、KM8869、KM8870、KM8871の反応性をそれぞれ示す。

【図18】は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のヒトメラノーマ細胞株G-361及びSK-MEL-28に対するCDC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□がKM871、□がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の活性をそれぞれ示す。

【図19】は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のヒトメラノーマ細胞株G-361及びSK-MEL-28に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□がKM871、□がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の活性をそれぞれ示す。

【図20】はプラスミドpBSA-Bの造成工程を示した図である。

【図21】はプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2の造成工程を示した図である。

【図22】はプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2の造成工程を示した図である。

【図23】はプラスミドpKANTE Δ 8871-hIL2の造成工程を示した図である。

【図24】は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2のSDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が低分子量マーカー、2がKM8871、3がKM8871-hIL-2、4が低分子量マーカー、5がKM8871、6がKM8871-hIL-2の泳動パターンをそれぞれ示す。

【図25】は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2のGD3との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がKM8871、■がKM8871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

【図26】は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2の各種ガングリオシドとの反応性を示した図である。縦軸にガングリオシドの種類、横軸に結合活性をそれぞれ示す。AcGM2はN-アセチルGM2、GcGM2はN-グリコリルGM2、AcGM3はN-アセチルGM3、GcGM3はN-グリコリルGM3を示す。□がKM8871、■がKM8871-hIL-2の反応性をそれぞれ示す。

【図27】は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2のヒトメラノーマ細胞株G-361との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。各図は上段より、KM8871、KM8871-hIL-2の反応性をそれぞれ示す。

【図28】はhIL-2と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2のhIL-2依存性細胞CTLL-2に対する増殖支持活性を各蛋白質の濃度を変化させて測定した図である。縦軸は増殖支持活性、横軸は蛋白質濃度をそれぞれ示す。○がhIL-2、●がKM8871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

【図29】は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2によるヒトエフェクター細胞の活性化とそれに伴う細胞障害活性を測定した図である。縦軸は細胞障害活性、横軸は用いた蛋白質をそれぞれ示す。□がKM8871、■がKM8871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

【図30】はプラスミドpKANTEX871-hIL2の造成工程を示した図である。

【図31】は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2のSDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。左側が還元条件、右側が非還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が低分子量マーカー、2がKM871、3がKM871-hIL-2、4が低分子量マーカー、5がKM871、6がKM871-hIL-2の泳動パターンをそれぞれ示す。

【図32】は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2のGD3との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●がKM871、□がKM871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

【図33】は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2の各種ガングリオシドとの反応性を示した図である。縦軸にガングリオシドの種類、横軸に

結合活性をそれぞれ示す。AcGM2はN-アセチルGM2、GcGM2はN-グリコリルGM2、AcGM3はN-アセチルGM3、GcGM3はN-グリコリルGM3を示す。■がKM871、□がKM871-hIL-2の反応性をそれぞれ示す。

【図34】は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2のヒトメラノーマ細胞株G-361及びSK-MEL-28との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。各図は上段より、G361細胞に対するKM871の反応性、G361細胞に対するKM871-hIL-2の反応性、SK-MEL-28細胞に対するKM871の反応性、SK-MEL-28細胞に対するKM871-hIL-2の反応性をそれぞれ示す。

【図35】はhIL-2と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2のhIL-2依存性細胞CTLL-2に対する増殖支持活性を各蛋白質の濃度を変化させて測定した図である。縦軸は増殖支持活性、横軸は蛋白質濃度をそれぞれ示す。●がhIL-2、○がKM871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

【図36】は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2によるヒトエフェクター細胞の活性化とそれに伴う細胞障害活性を測定した図である。縦軸は細胞障害活性、横軸は用いた蛋白質をそれぞれ示す。■がKM871、□がKM871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

【図37】はプラスミドpKANTEXGD3の造成工程を示した図である。

【図38】は抗GD3キメラ抗体KM871のGD3合成酵素遺伝子導入B16細胞株B16・29-10、B16・8-3及び親株のB16・F10細胞との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。各図は上段より、B16・F10細胞、B16・29-10及びB16・8-3の反応性をそれぞれ示す。

【図39】はGD3陽性B16細胞株B16・29-10を移植したBL/6マウスに対する抗GD3キメラ抗体KM871及びKM871-hIL-2の抗転移効果を測定した図である。グラフの縦軸は肺表面の転移巣の数、バーは各群の平均値を示す。非投与はコントロールの抗体非投与群を表す。◇はコントロール、○はKM871-IL-2投与、●はKM871投与マウスの肺転移巣の数をそれぞれ表す。

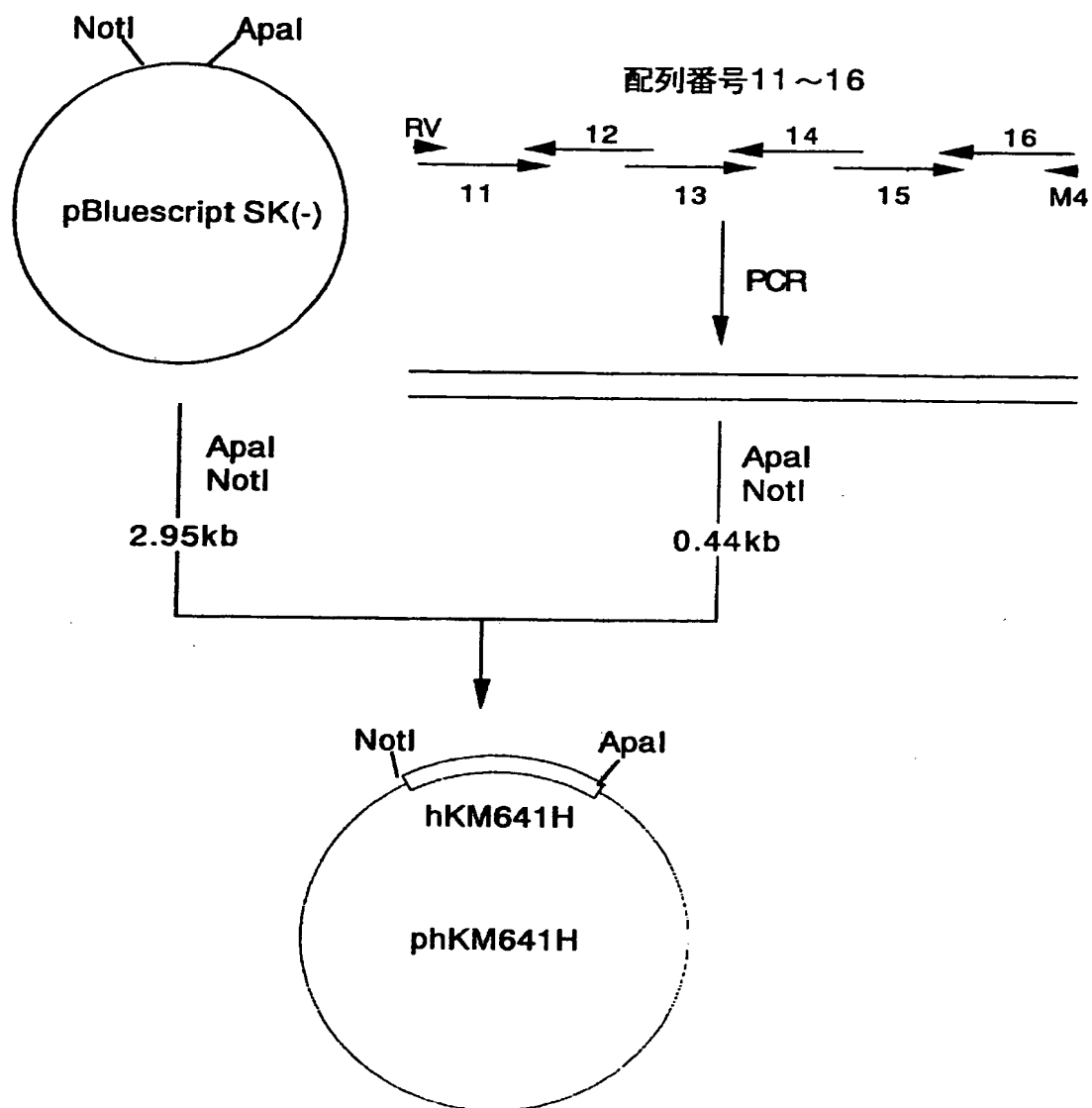
【図40】はGD3陽性B16細胞株B16・8-3を移植したBL/6マウスに対する抗GD3キメラ抗体KM871及びKM871-hIL-2の抗転移効果を測定した図である。グラフの縦軸は肺表面の転移巣の数、バーは各群の平均値を示す。非投与はコントロールの抗体

非投与群を表す。◇はコントロール、○はKM871-IL-2投与、●はKM871投与マウスの肺転移巣の数をそれぞれ表す。

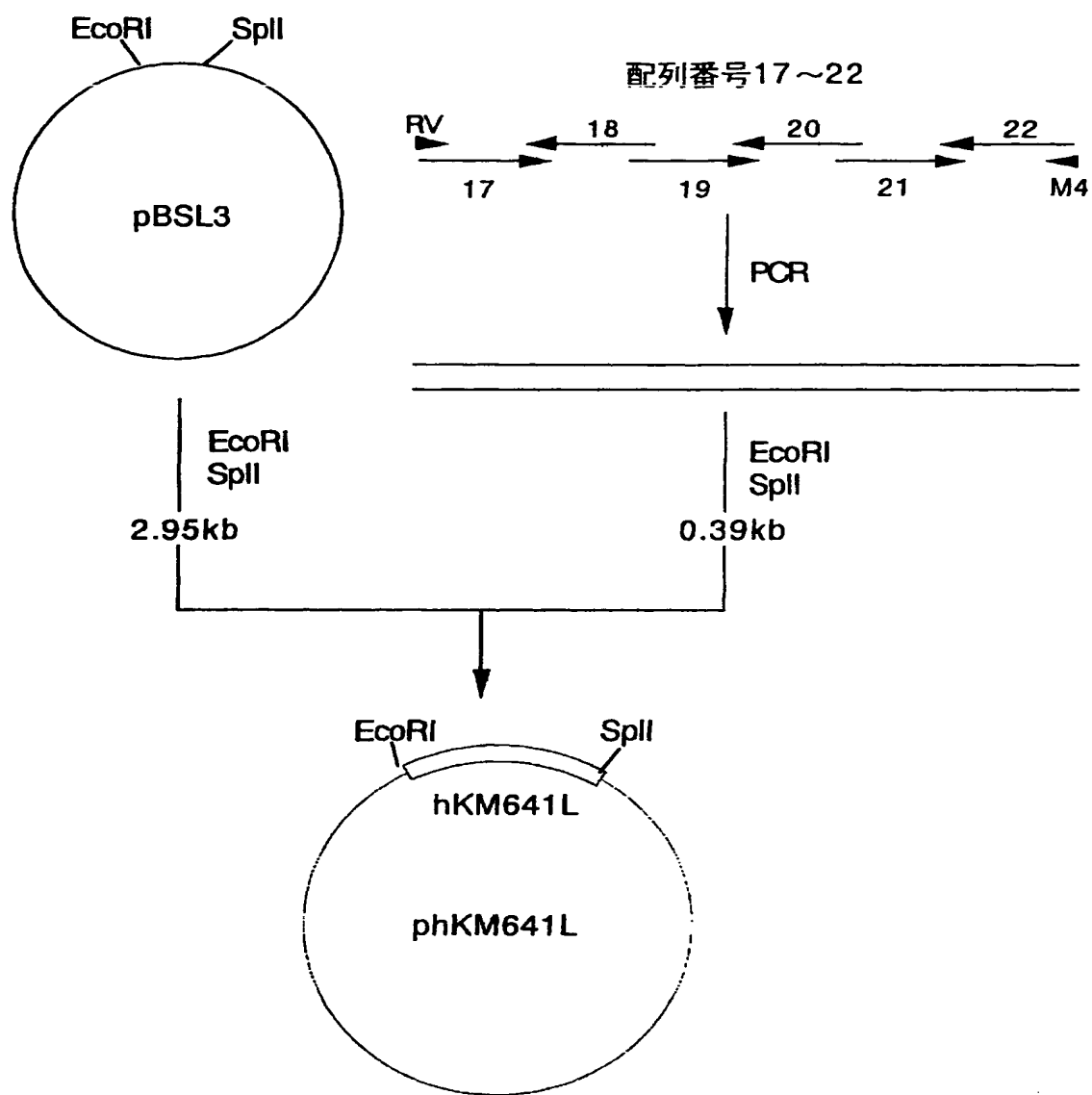
【図41】はGD3陽性B16細胞株B16・29-10を移植したBL/6マウスに対する抗GD3キメラ抗体KM871とhIL-2の併用投与及びKM871-hIL-2投与による抗転移効果を測定した図である。グラフの縦軸は肺表面の転移巣の数、バーは各群の平均値を示す。非投与はコントロールの抗体非投与群を表す。◇はコントロール、○はKM871-IL-2投与、●はKM871とhIL-2の併用投与マウスの肺転移巣の数をそれぞれ表す。

【書類名】 図面

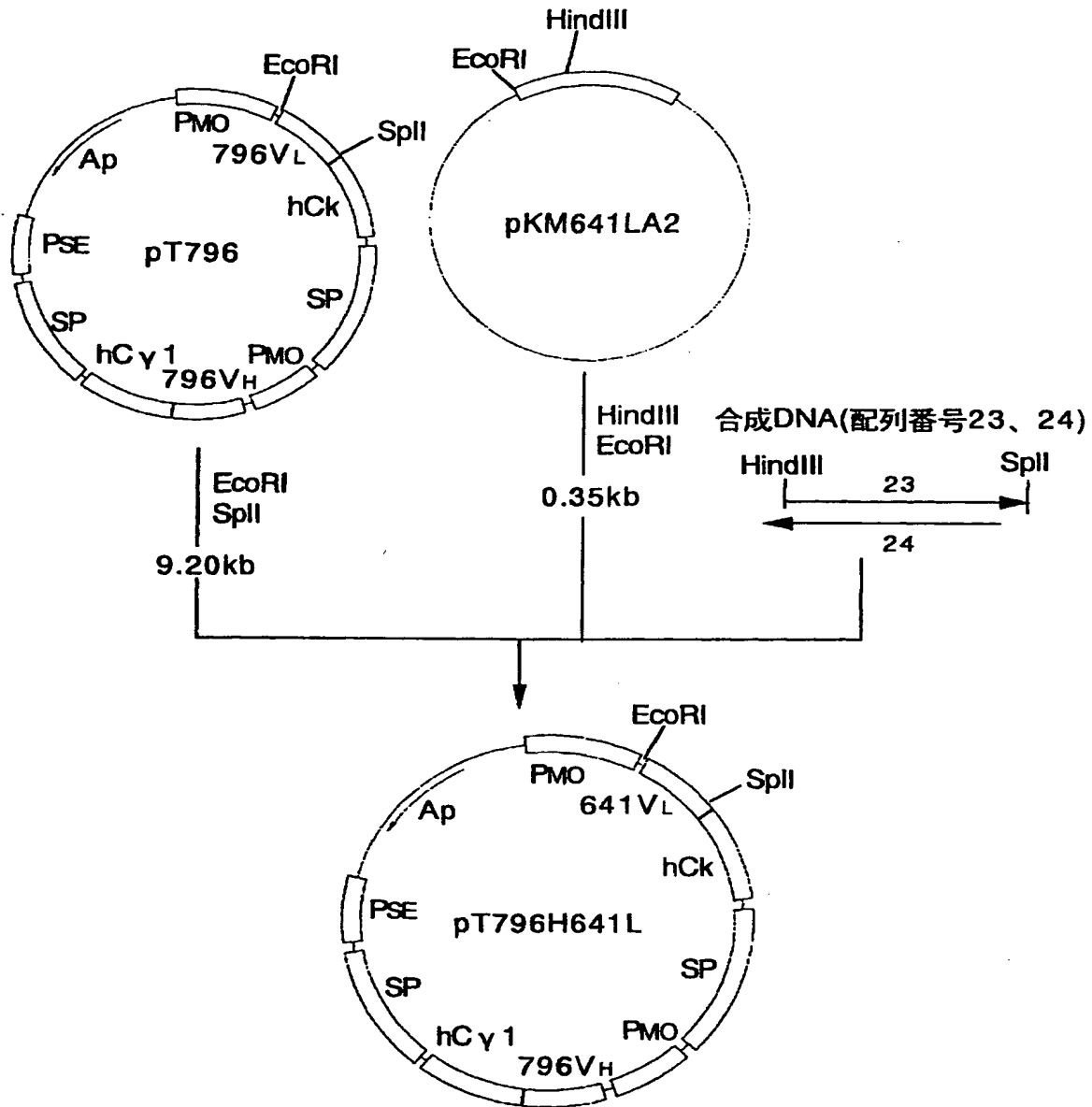
【図 1】



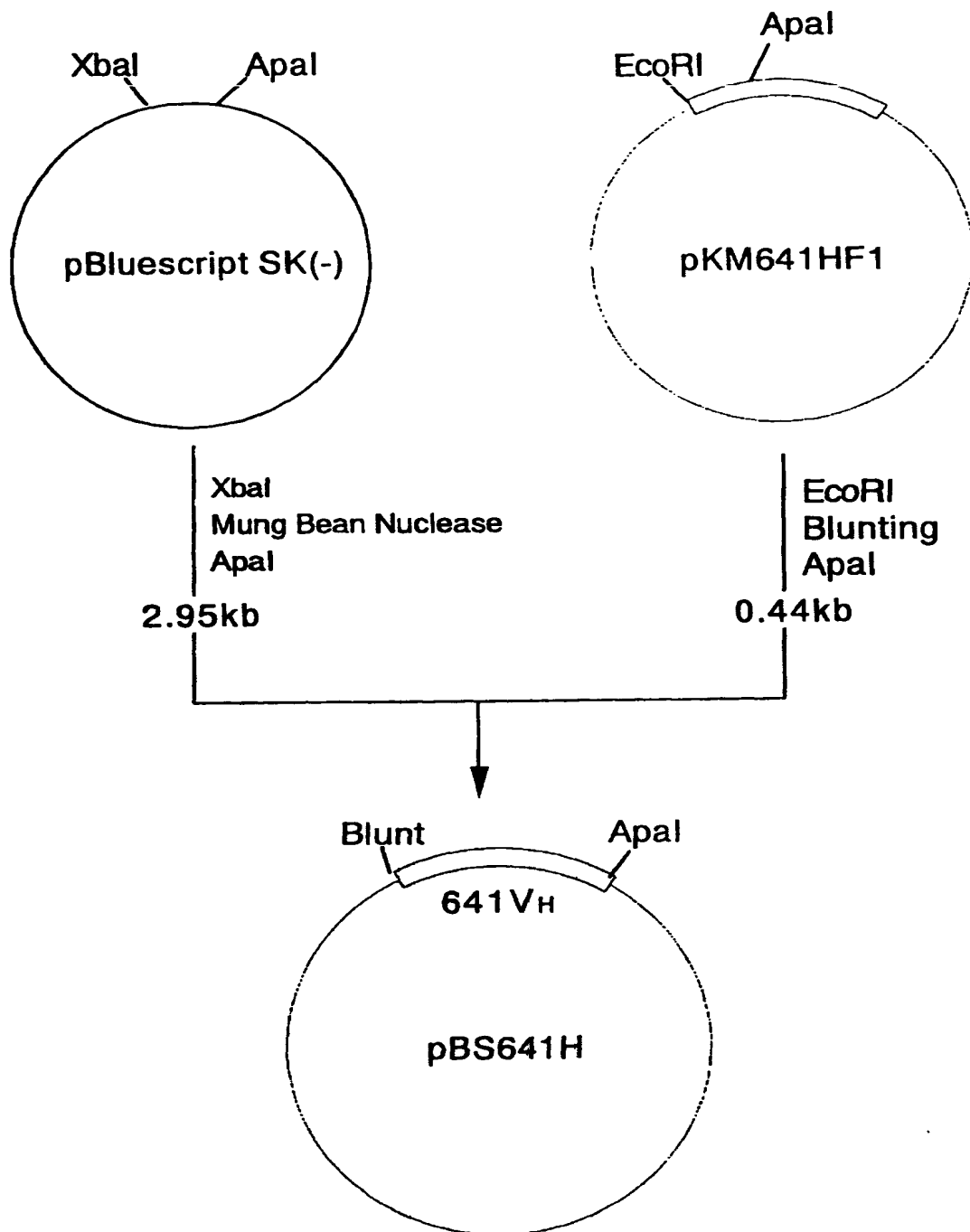
【図 2】



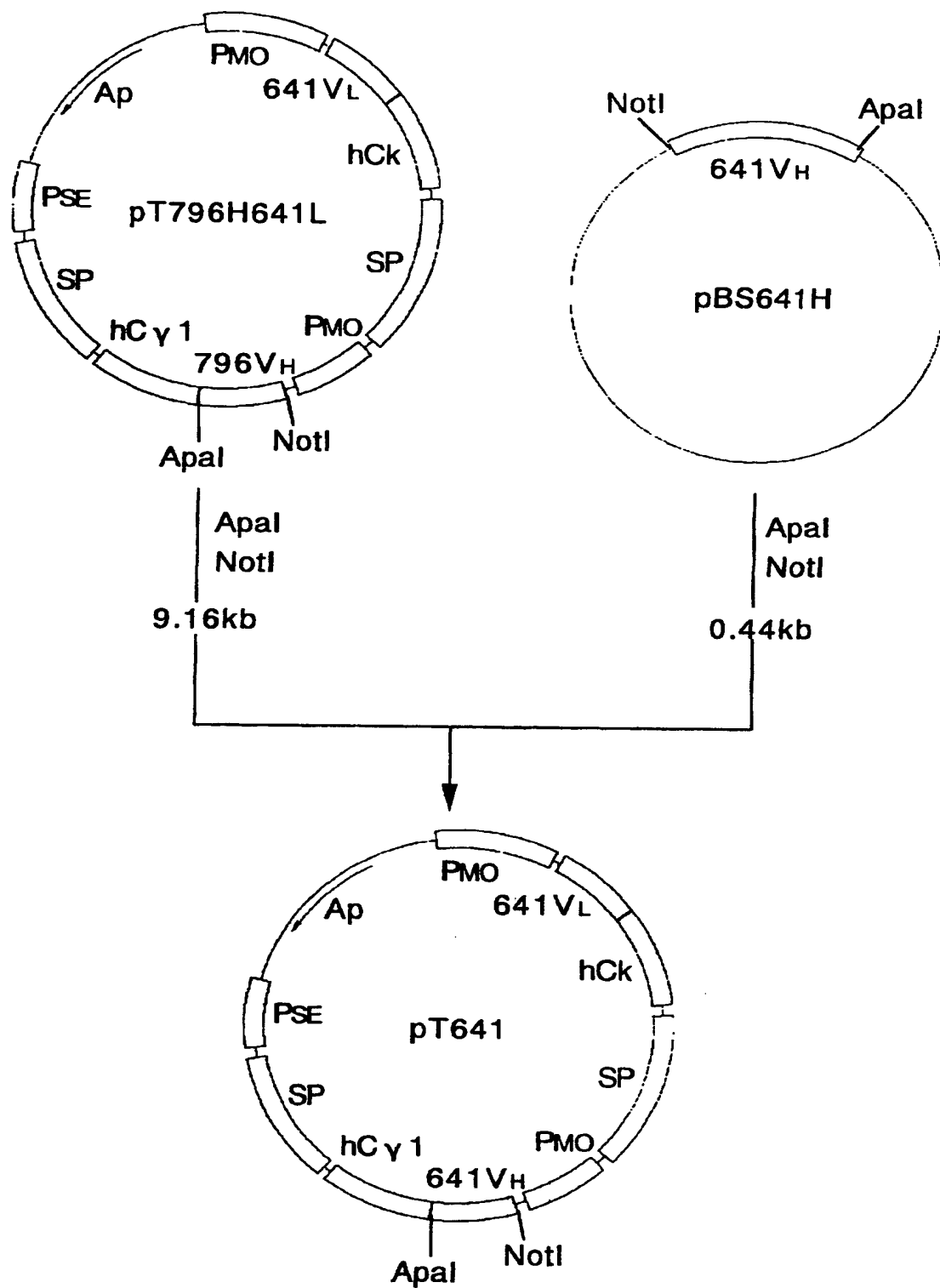
【図3】



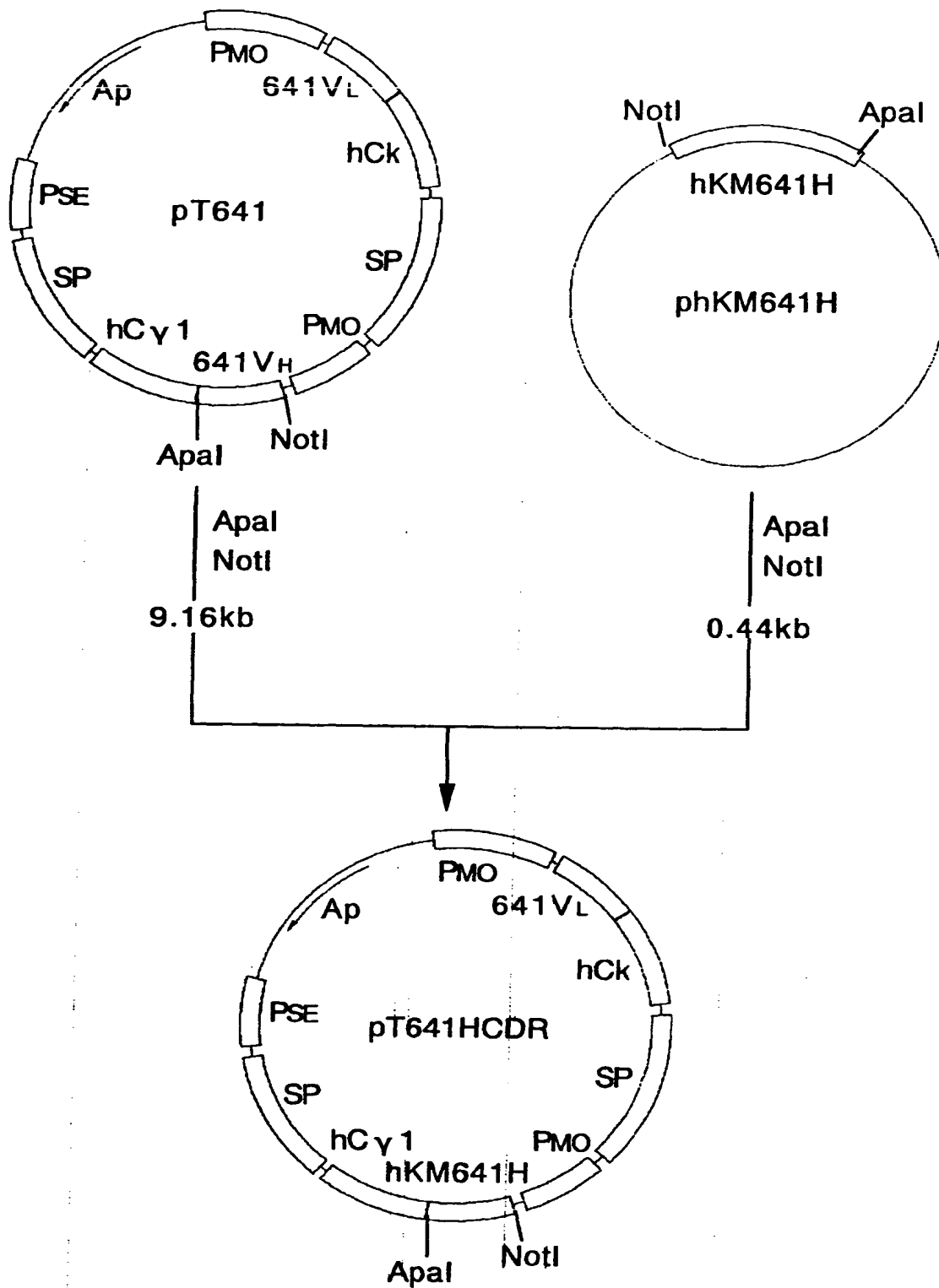
【図 4】



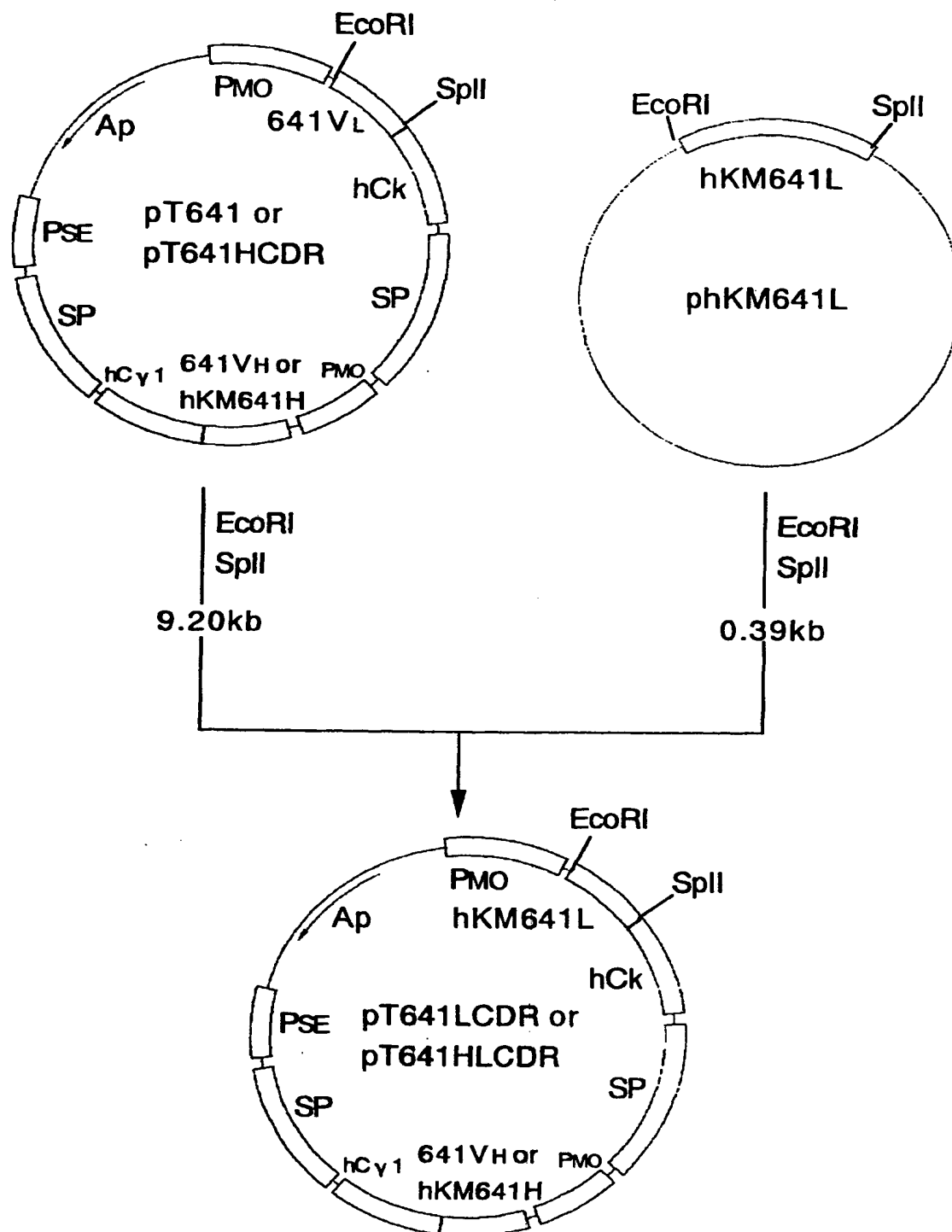
【図5】



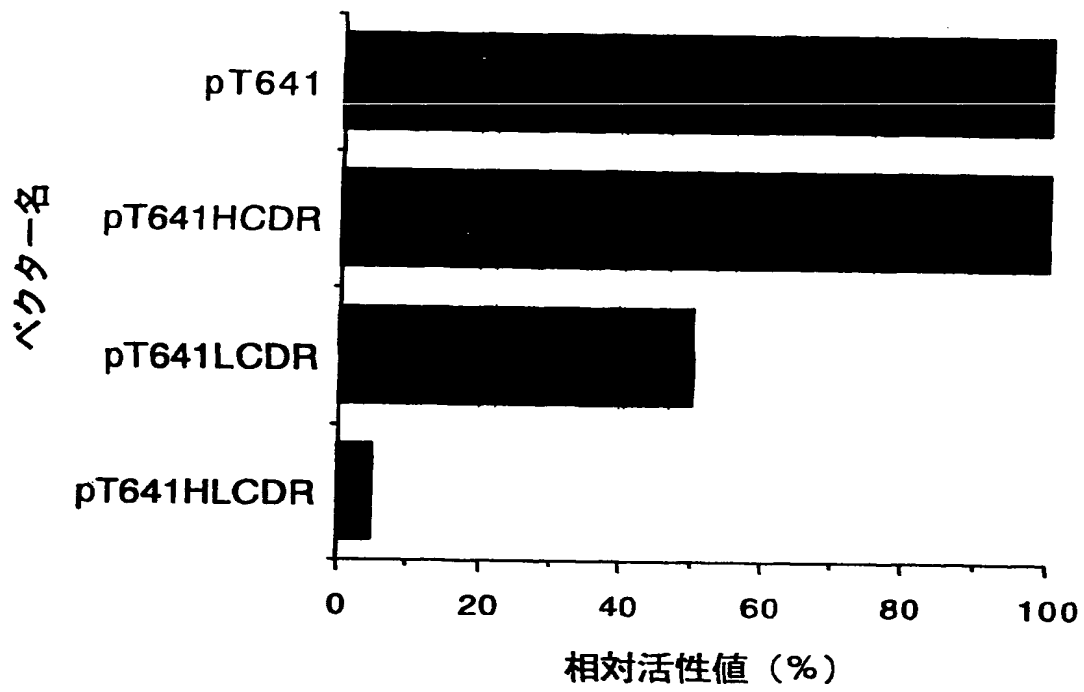
【図6】



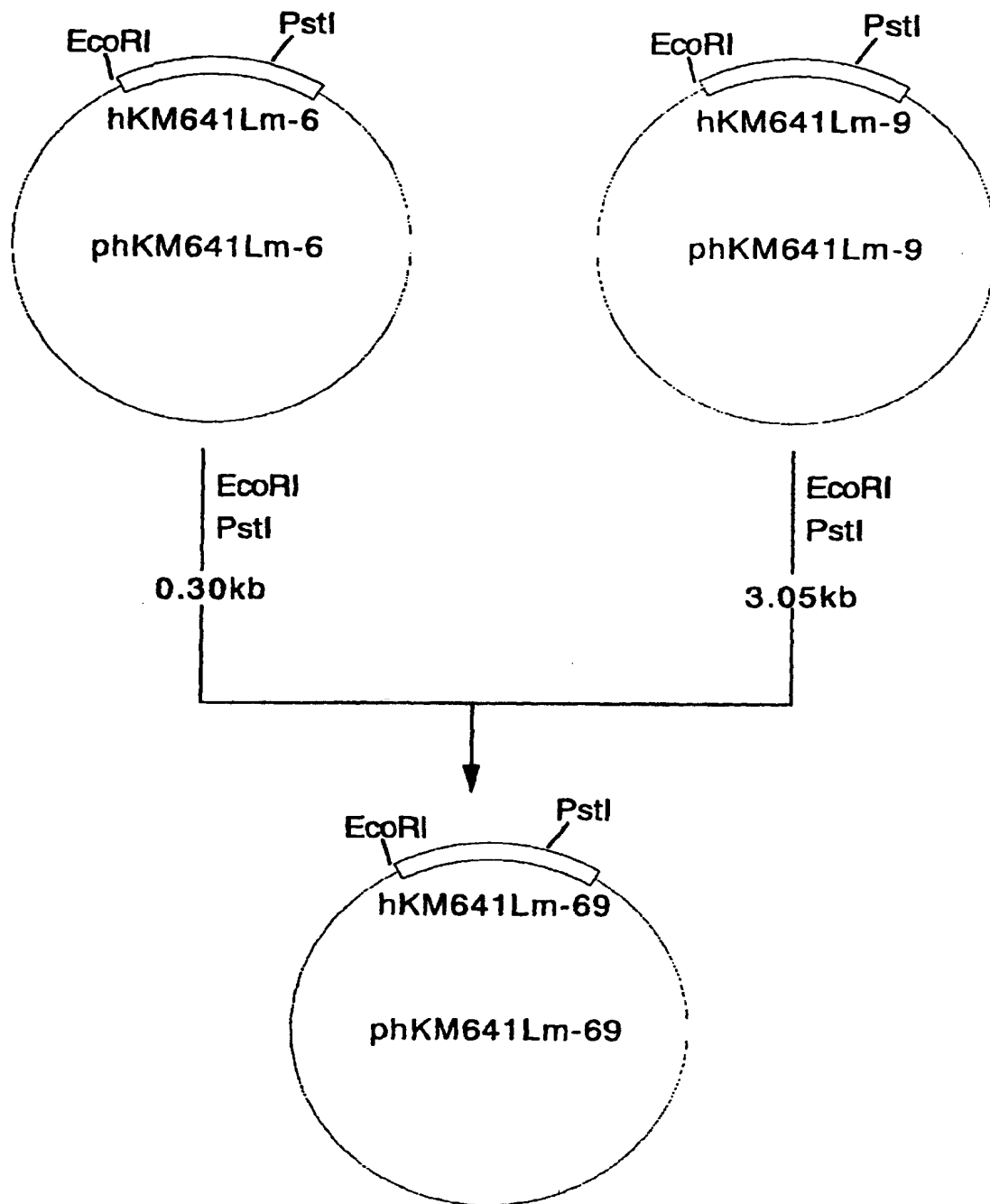
【図7】



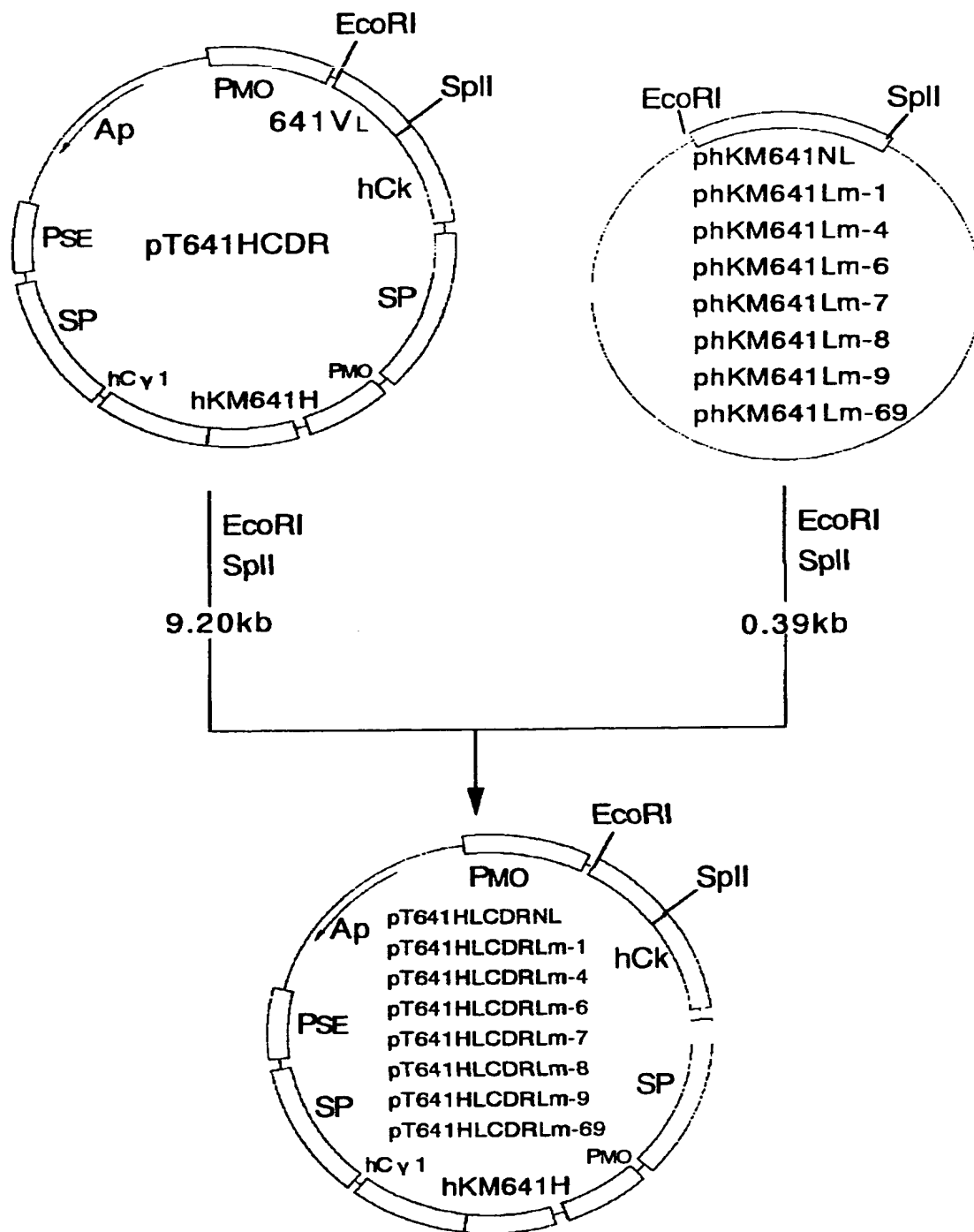
【図 8】



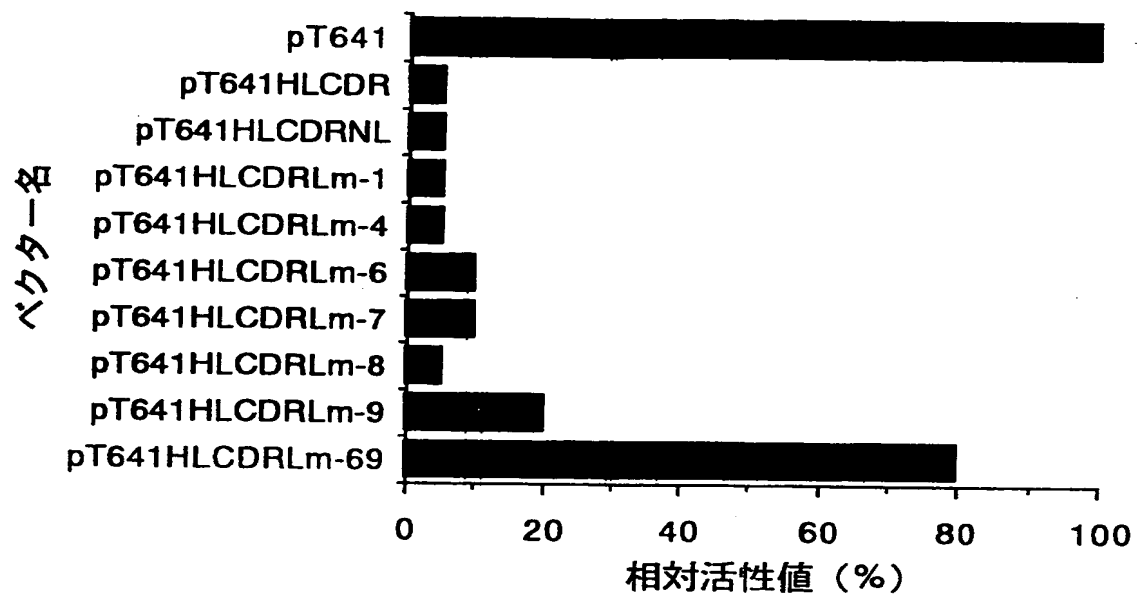
【図9】



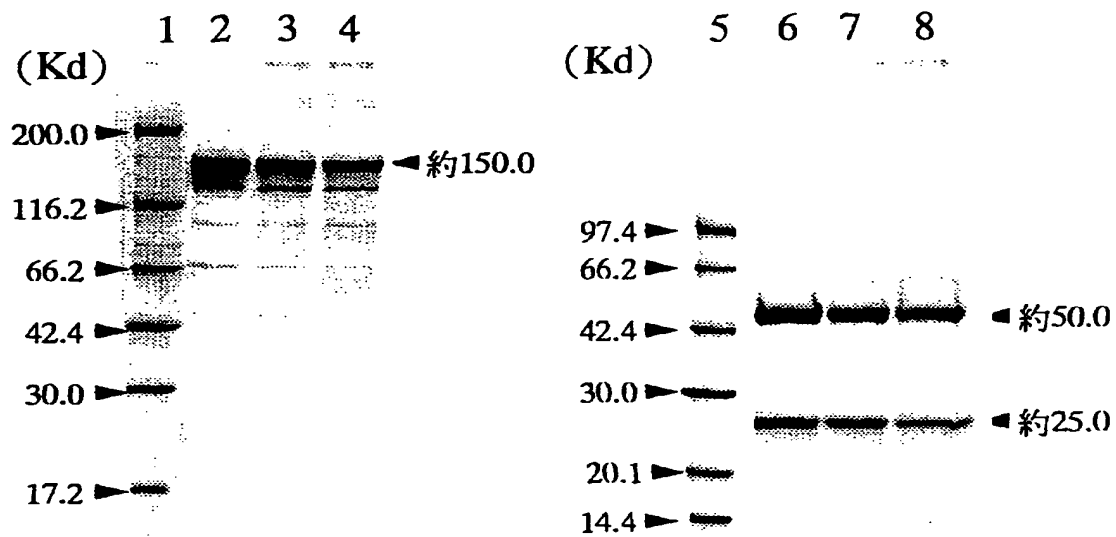
【図10】



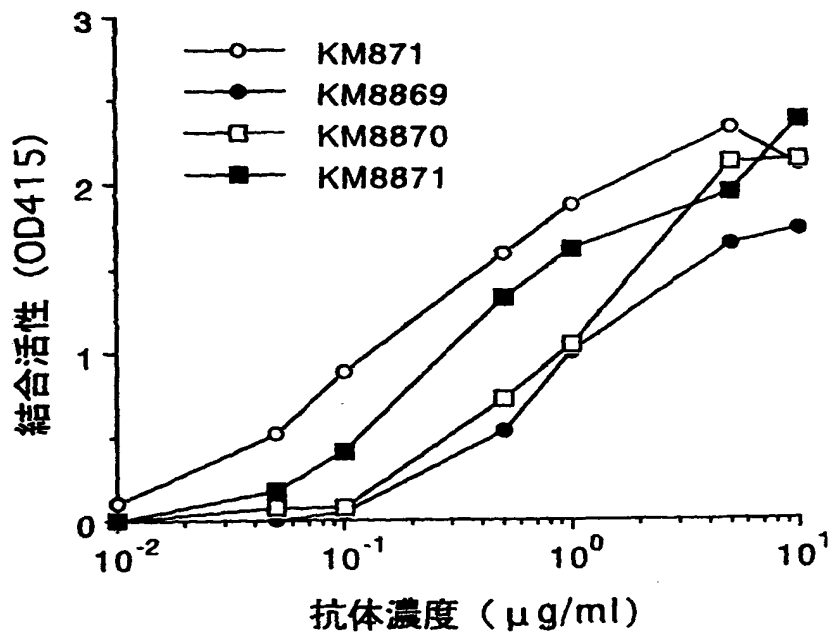
【図 1 1】



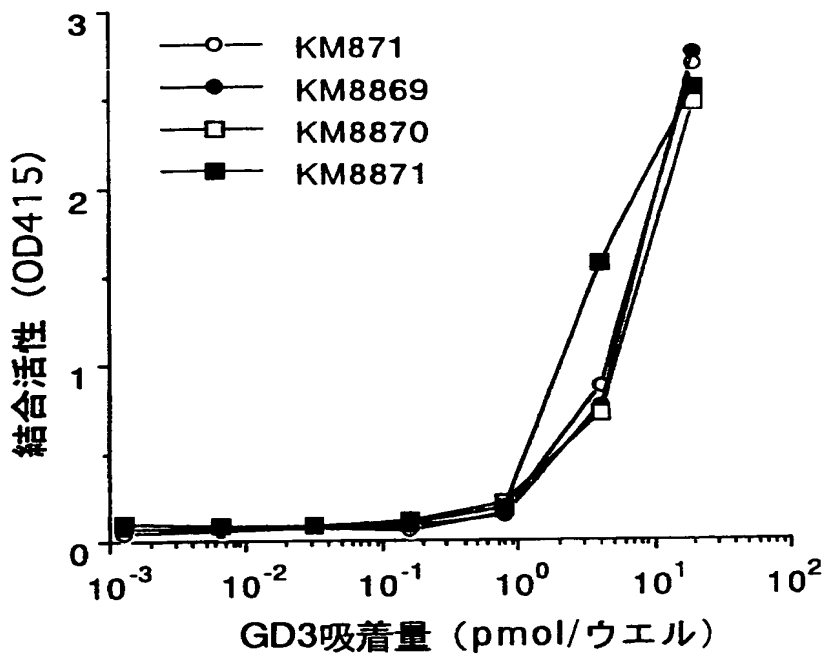
【図13】



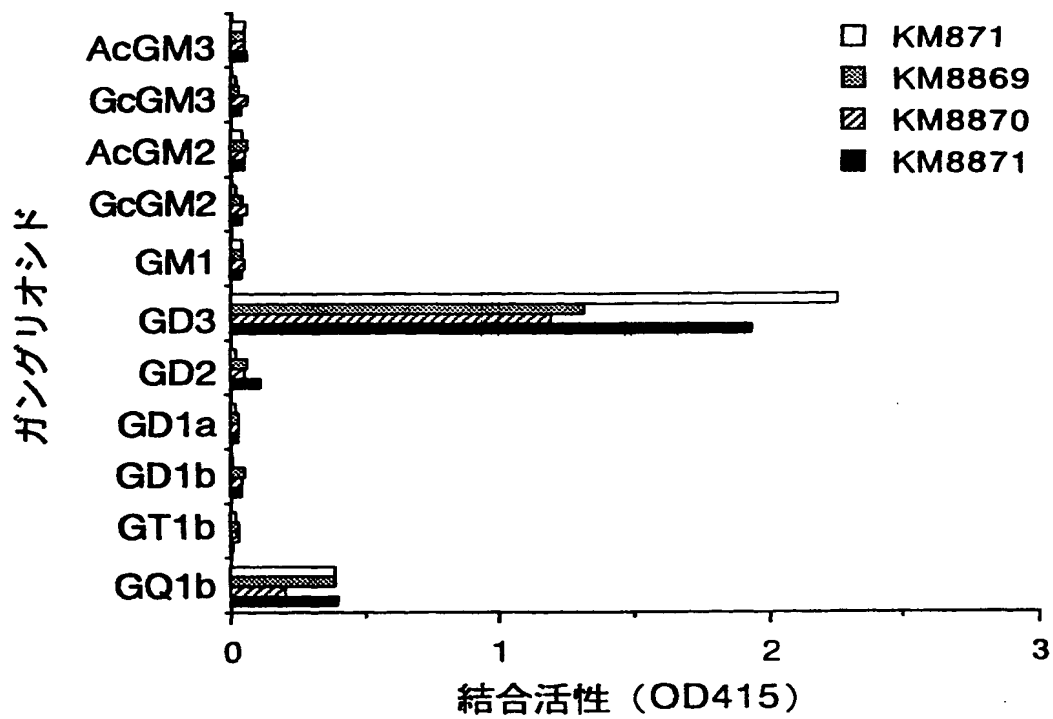
【図14】



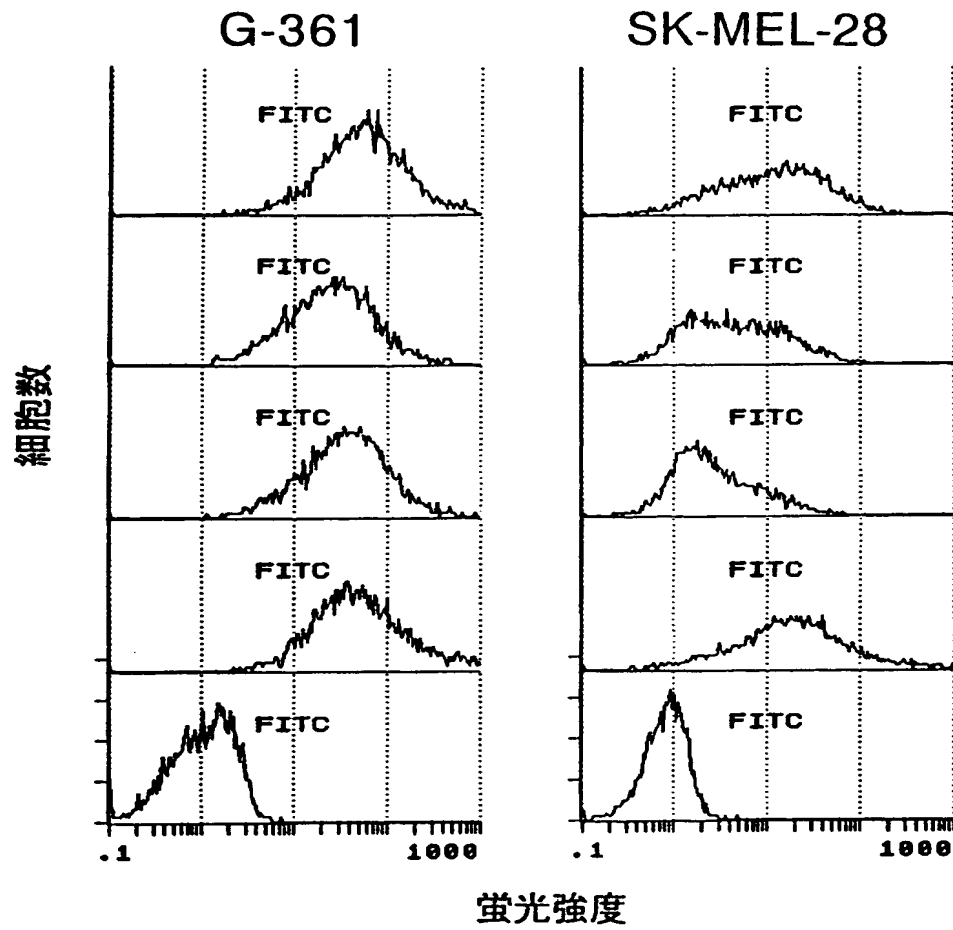
【図15】



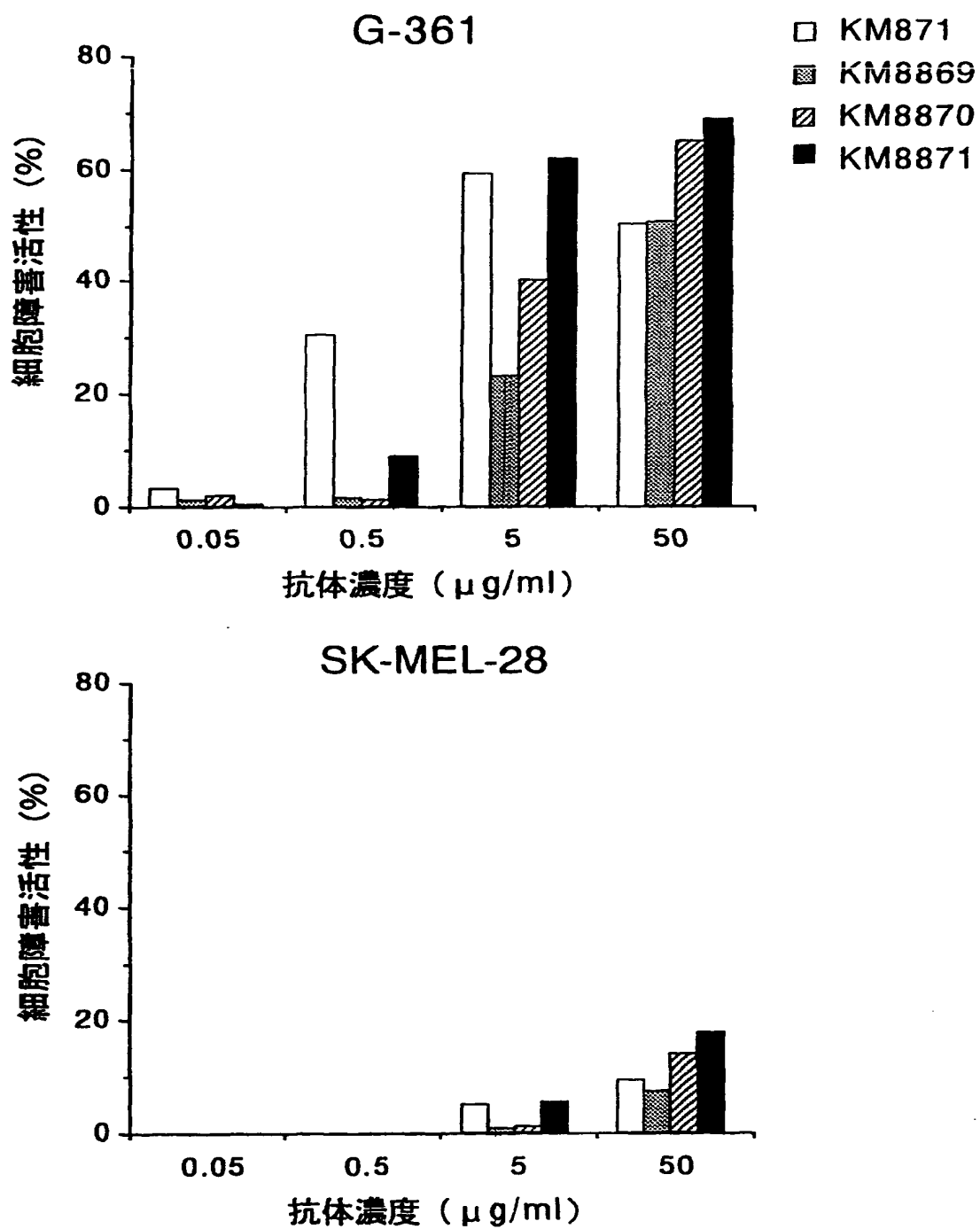
【図16】



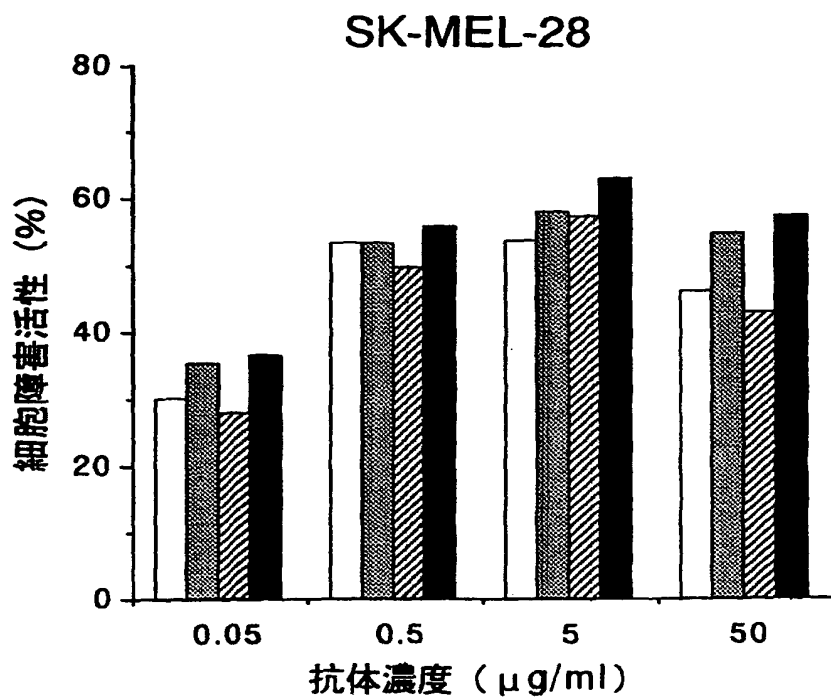
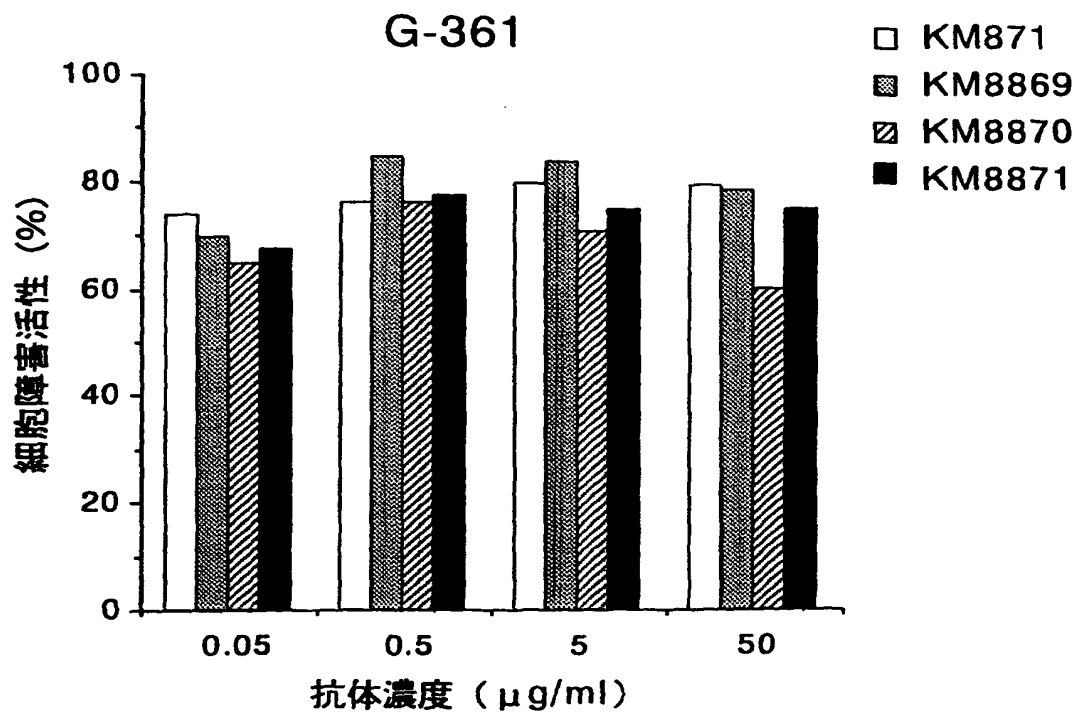
【図17】



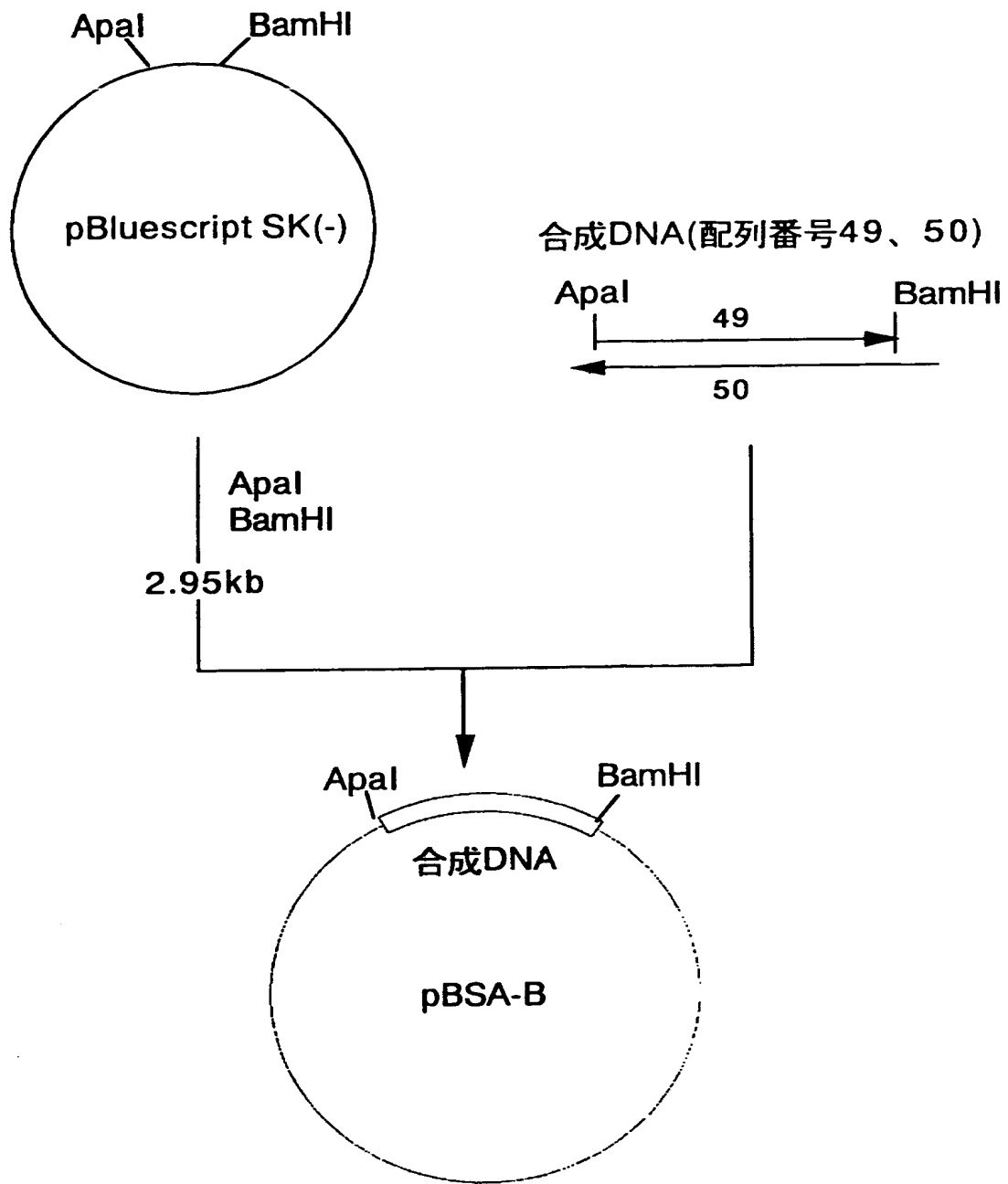
【図 18】



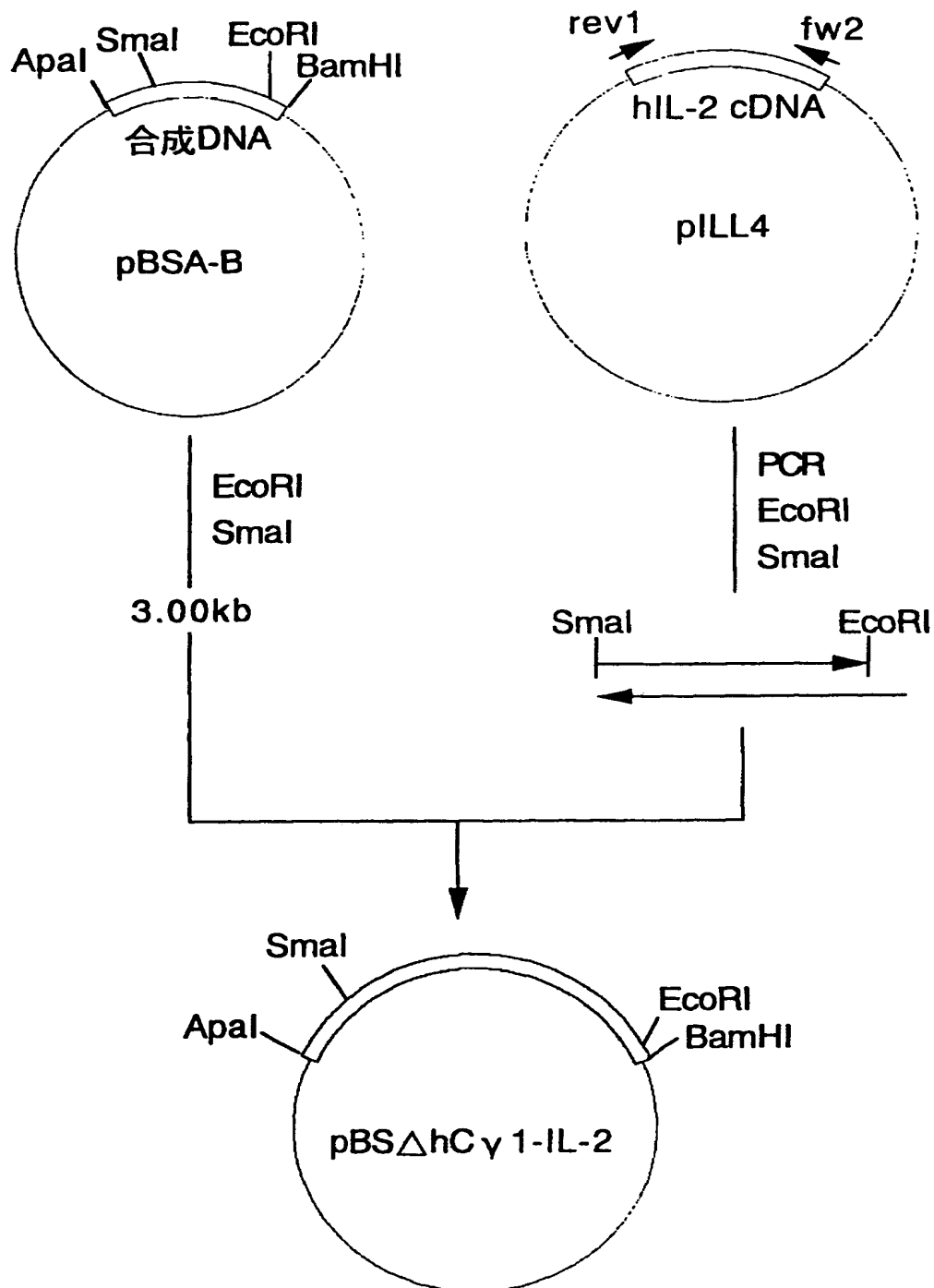
【図19】



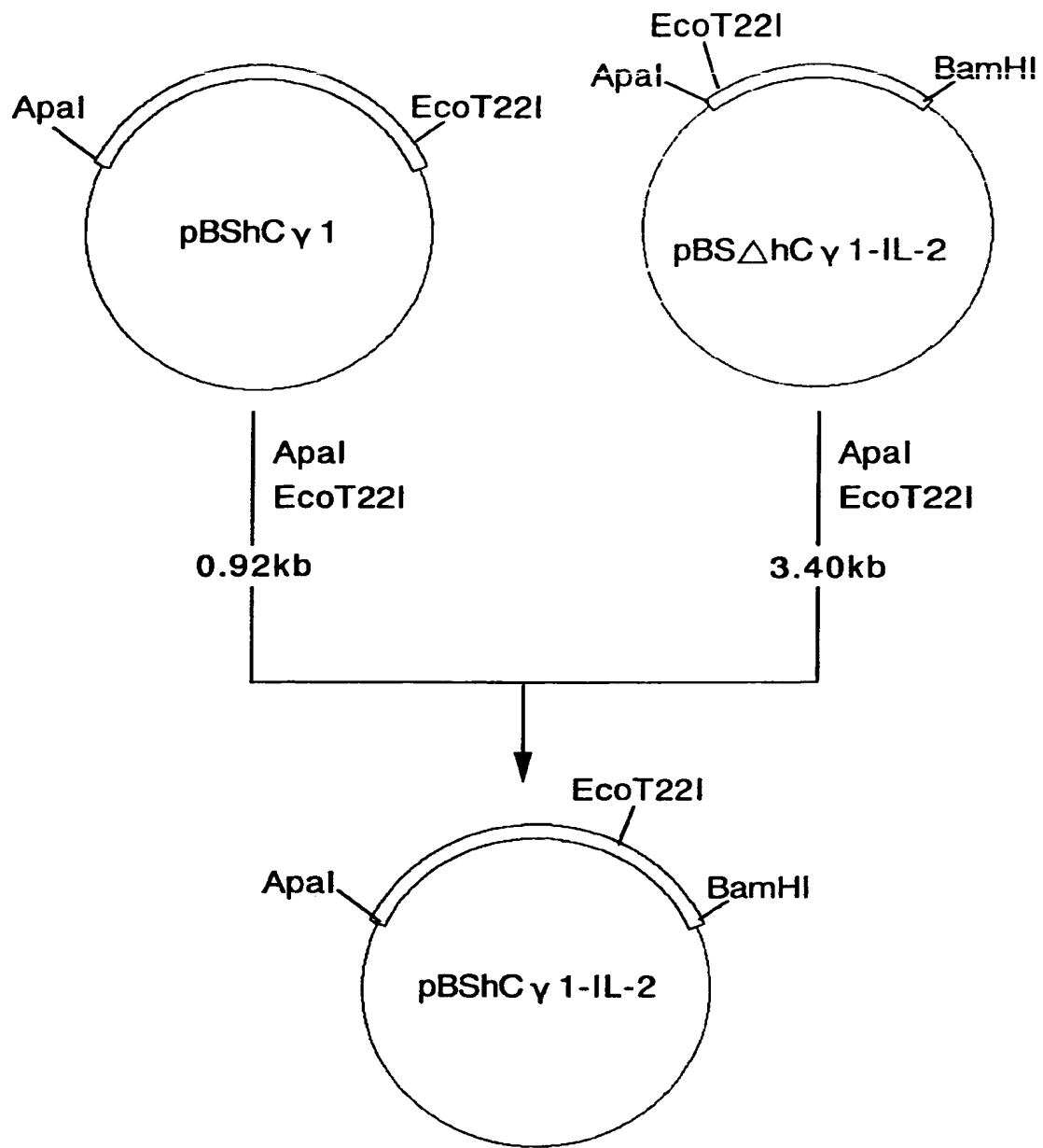
【図 2 0】



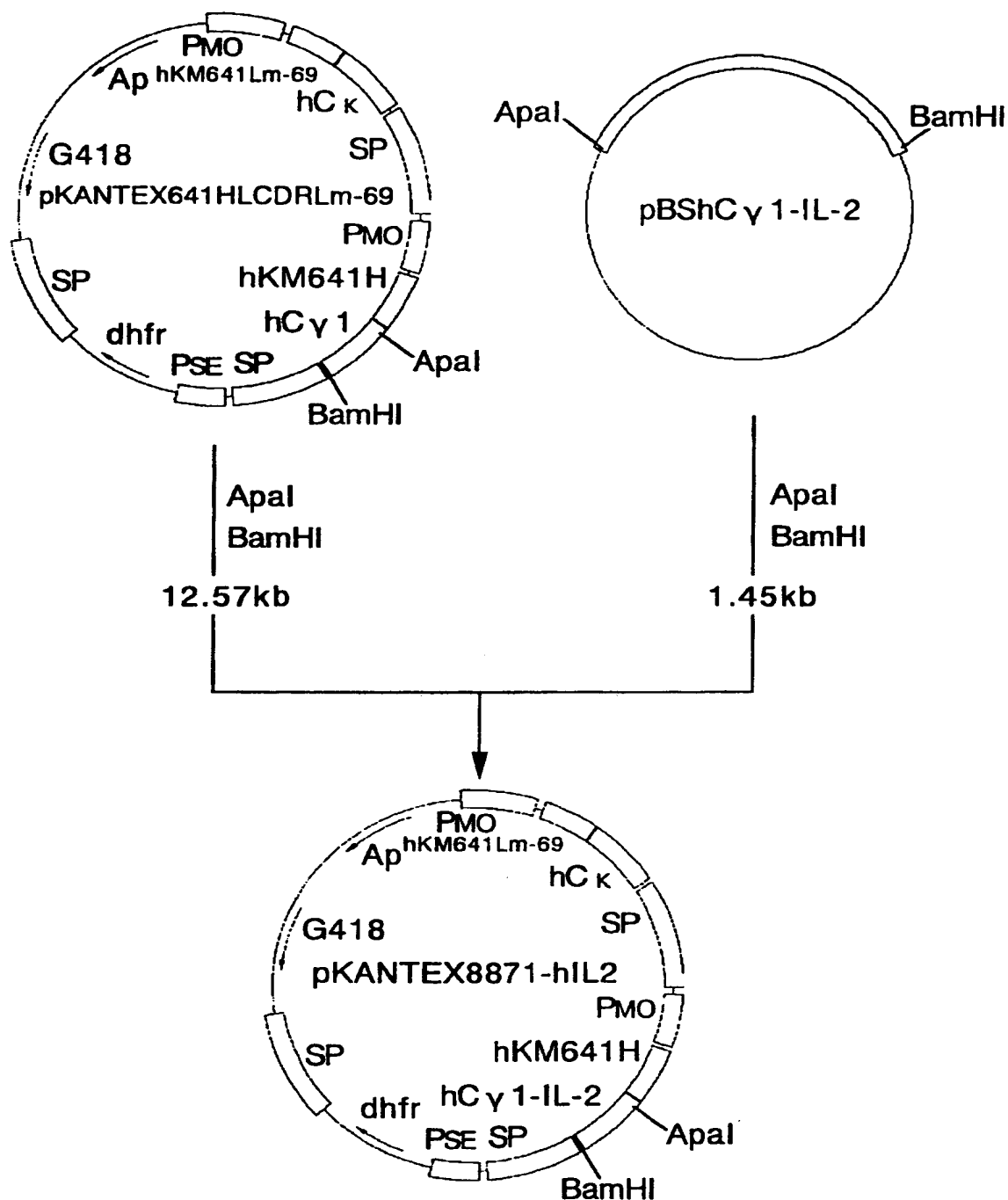
【図 2 1】



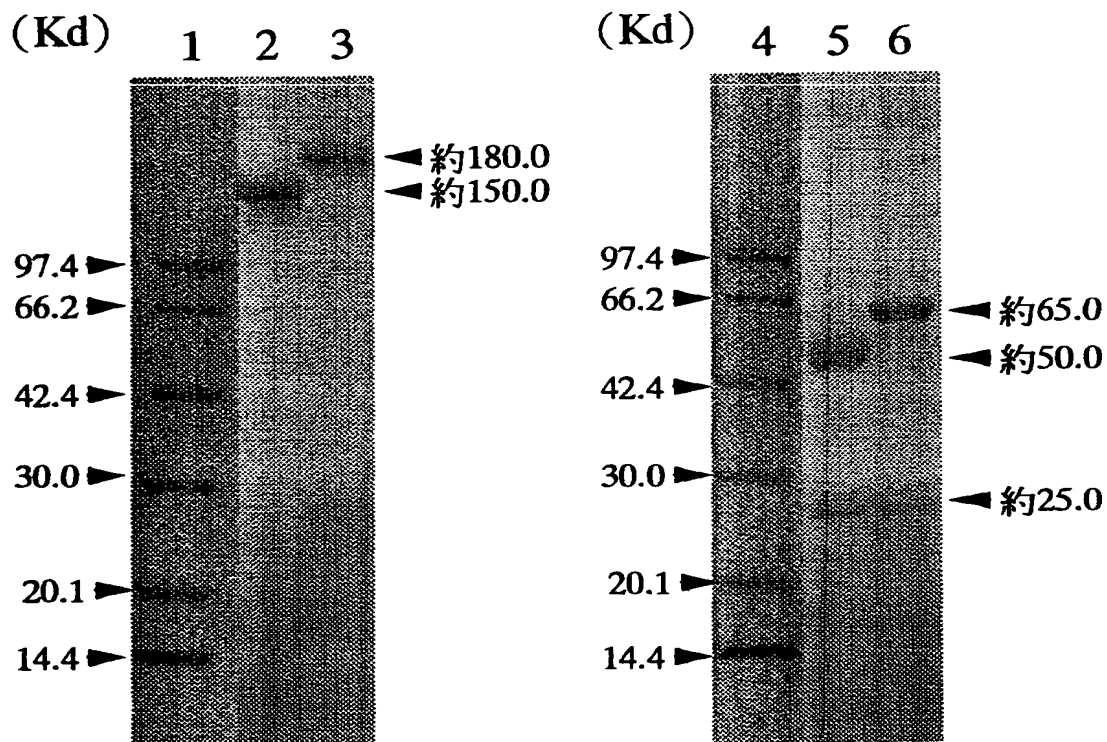
【図 22】



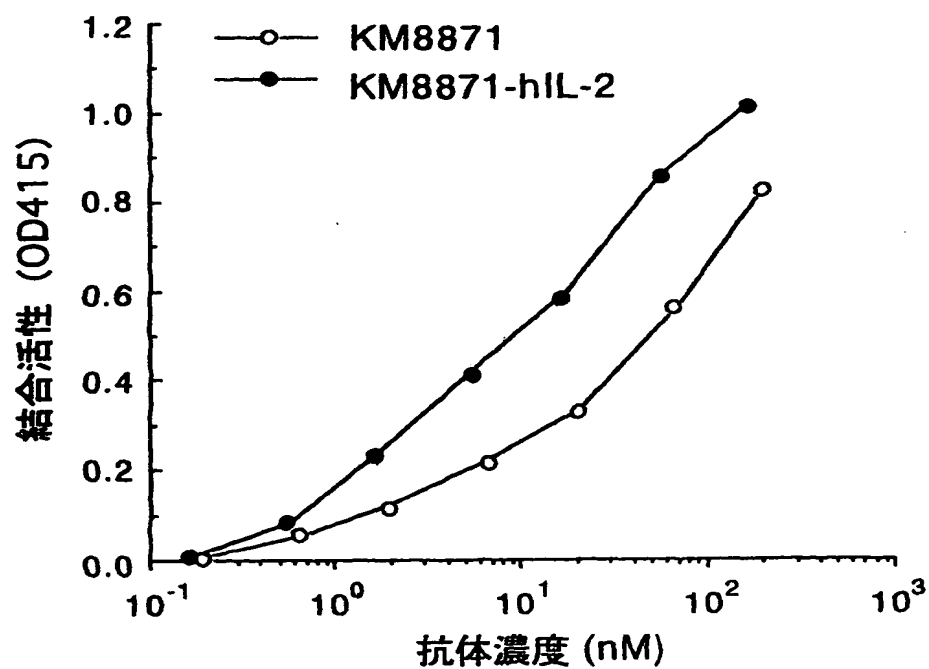
【図 2 3】



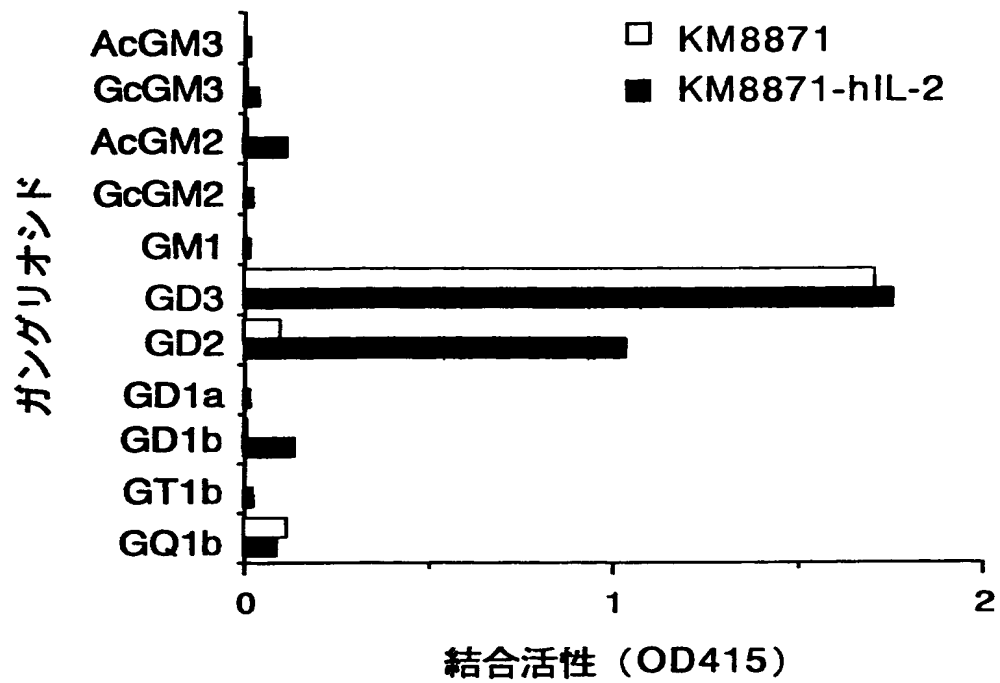
【図24】



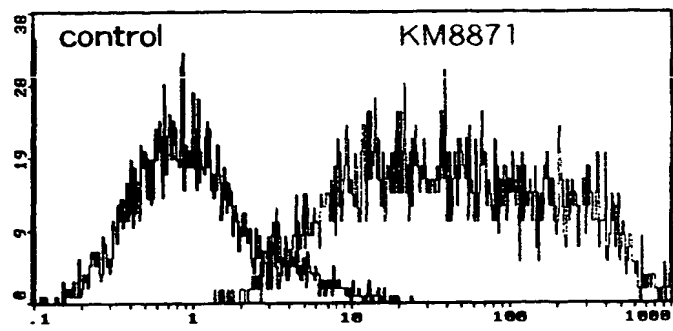
【図25】



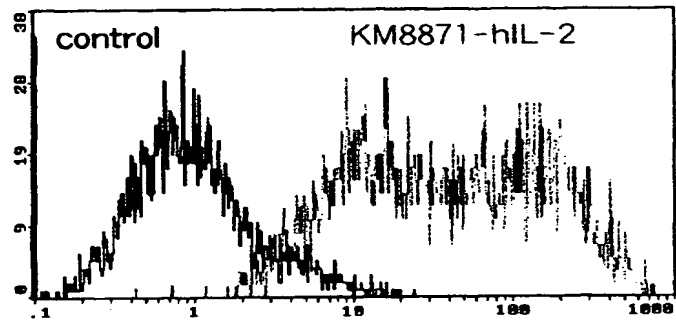
【図 2 6】



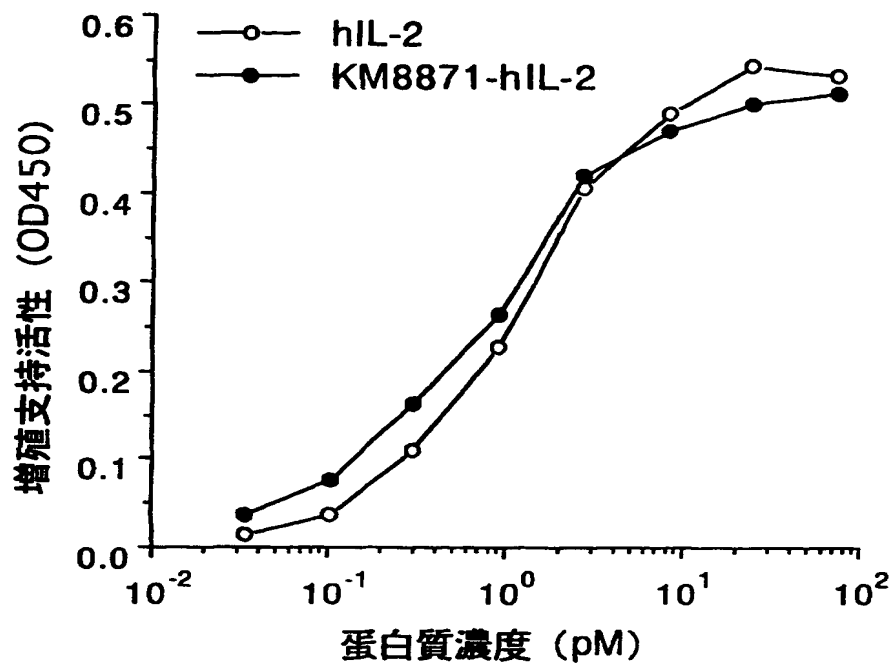
【図27】



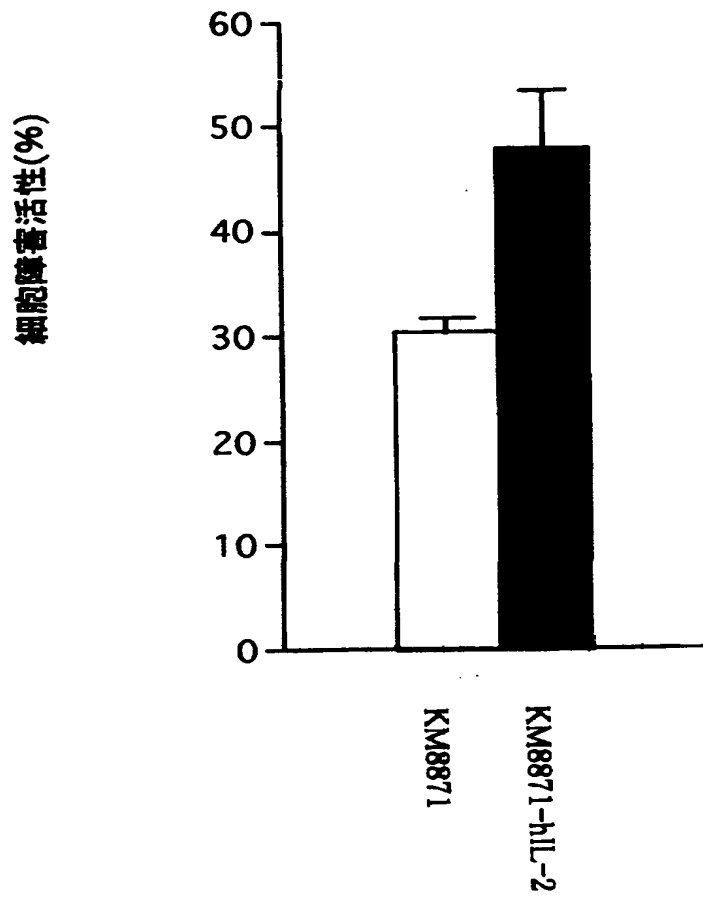
G361細胞



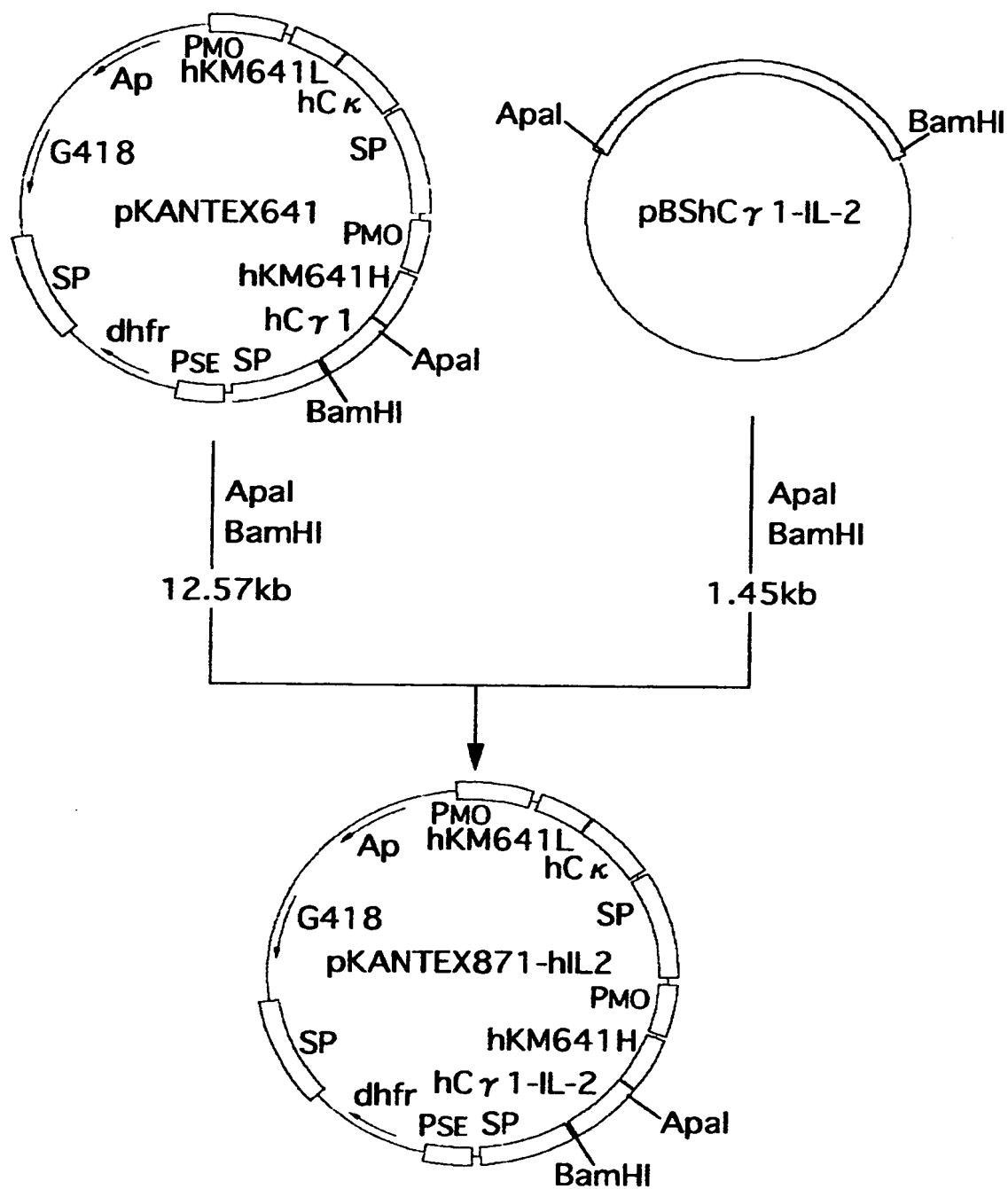
【図 28】



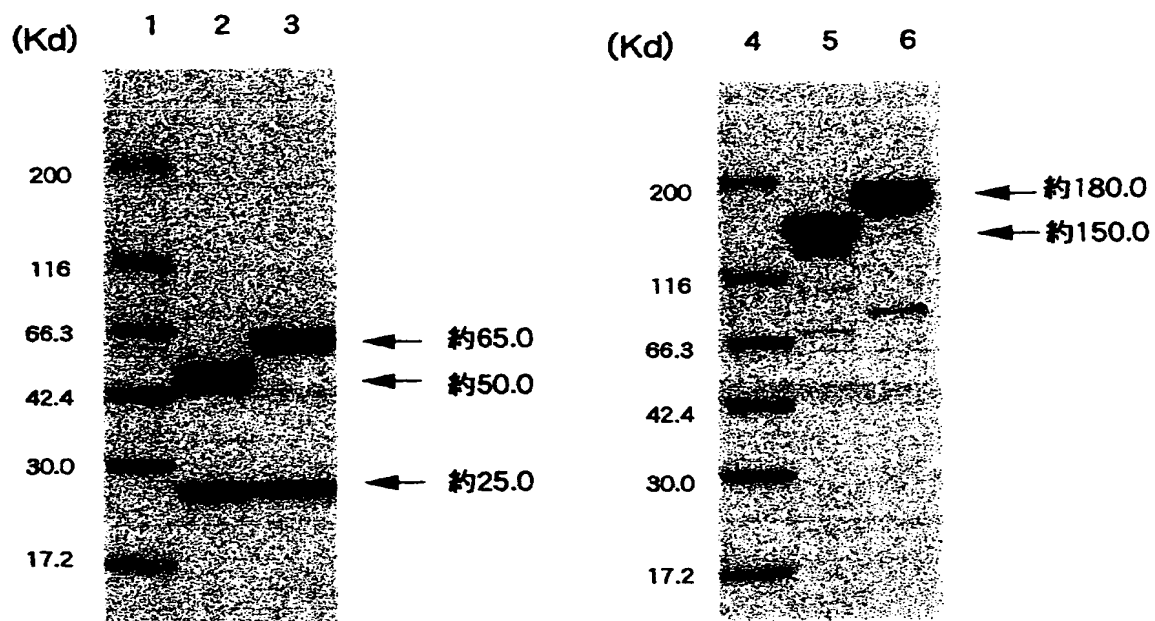
【図 2 9】



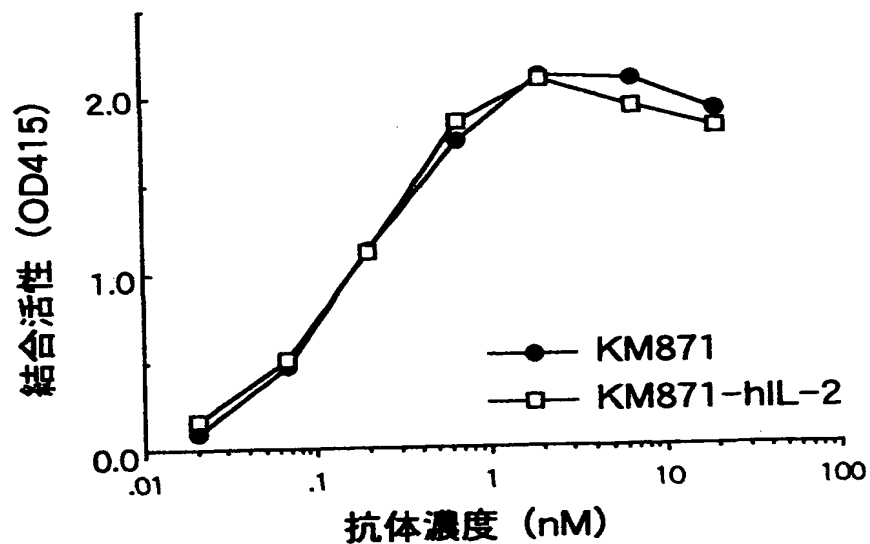
【図30】



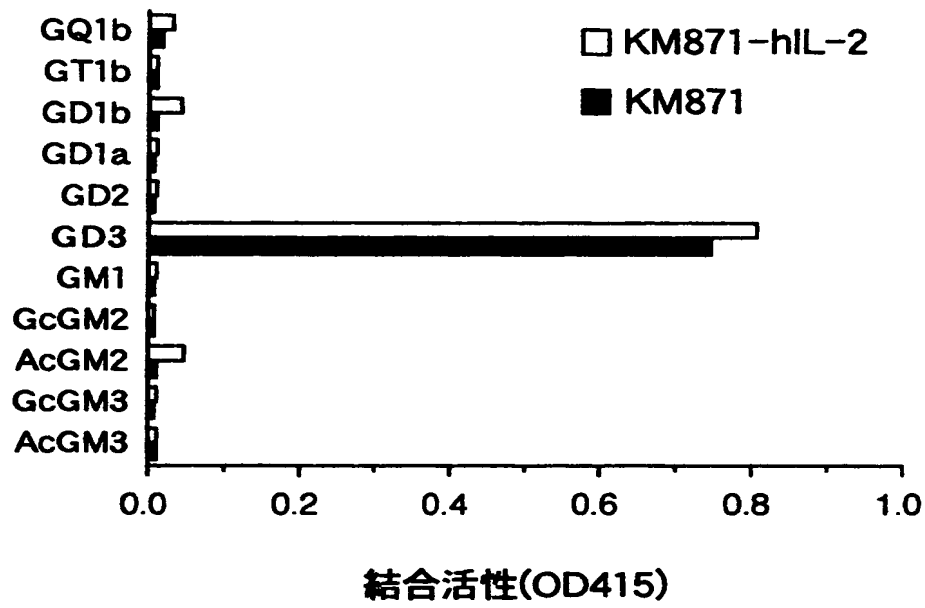
【図 3 1】



【図 3 2】

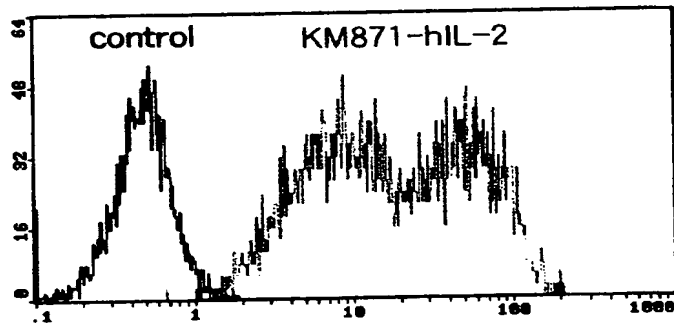
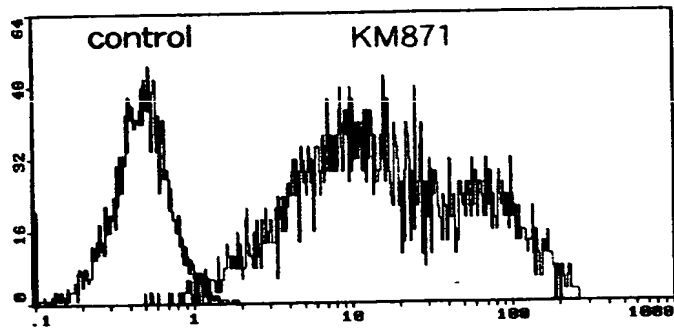


【図 3 3】

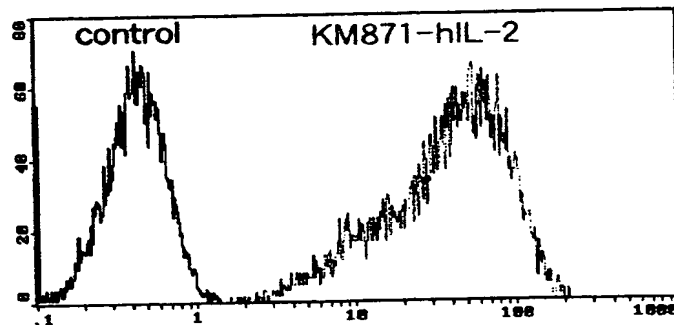
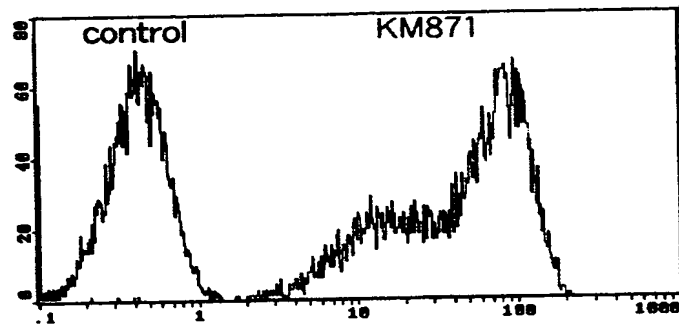


【図34】

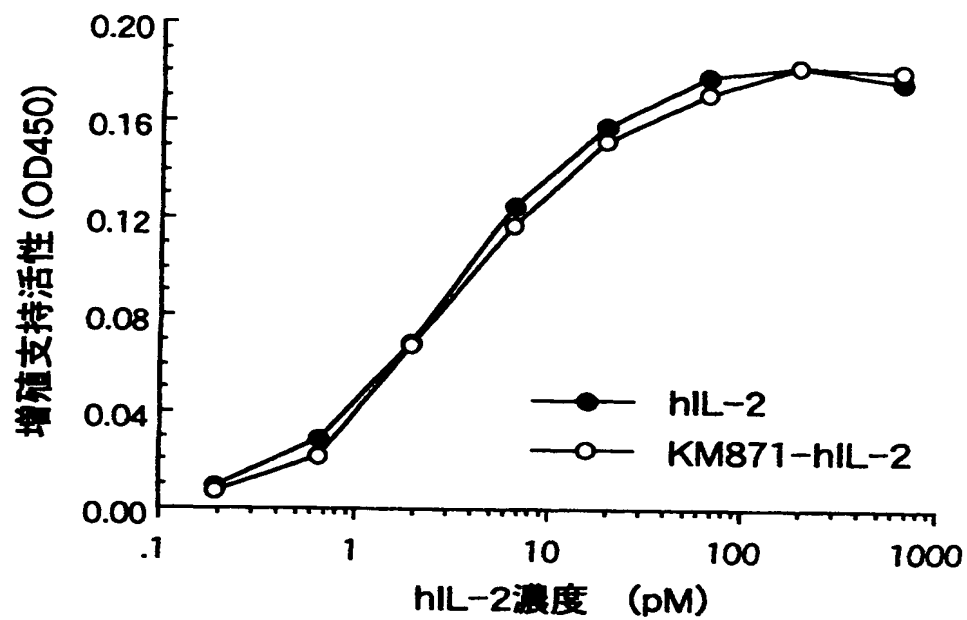
G361細胞



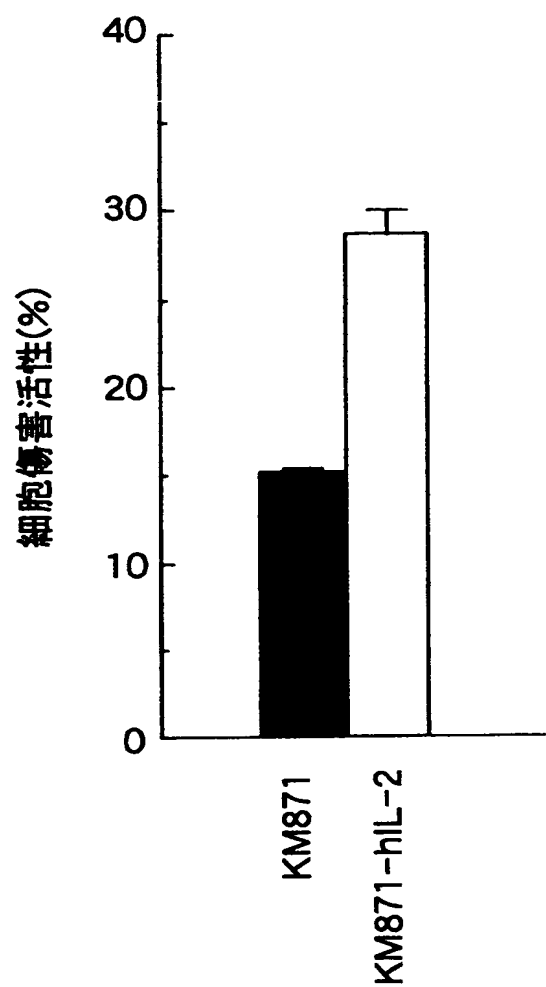
SK-MEL-28細胞



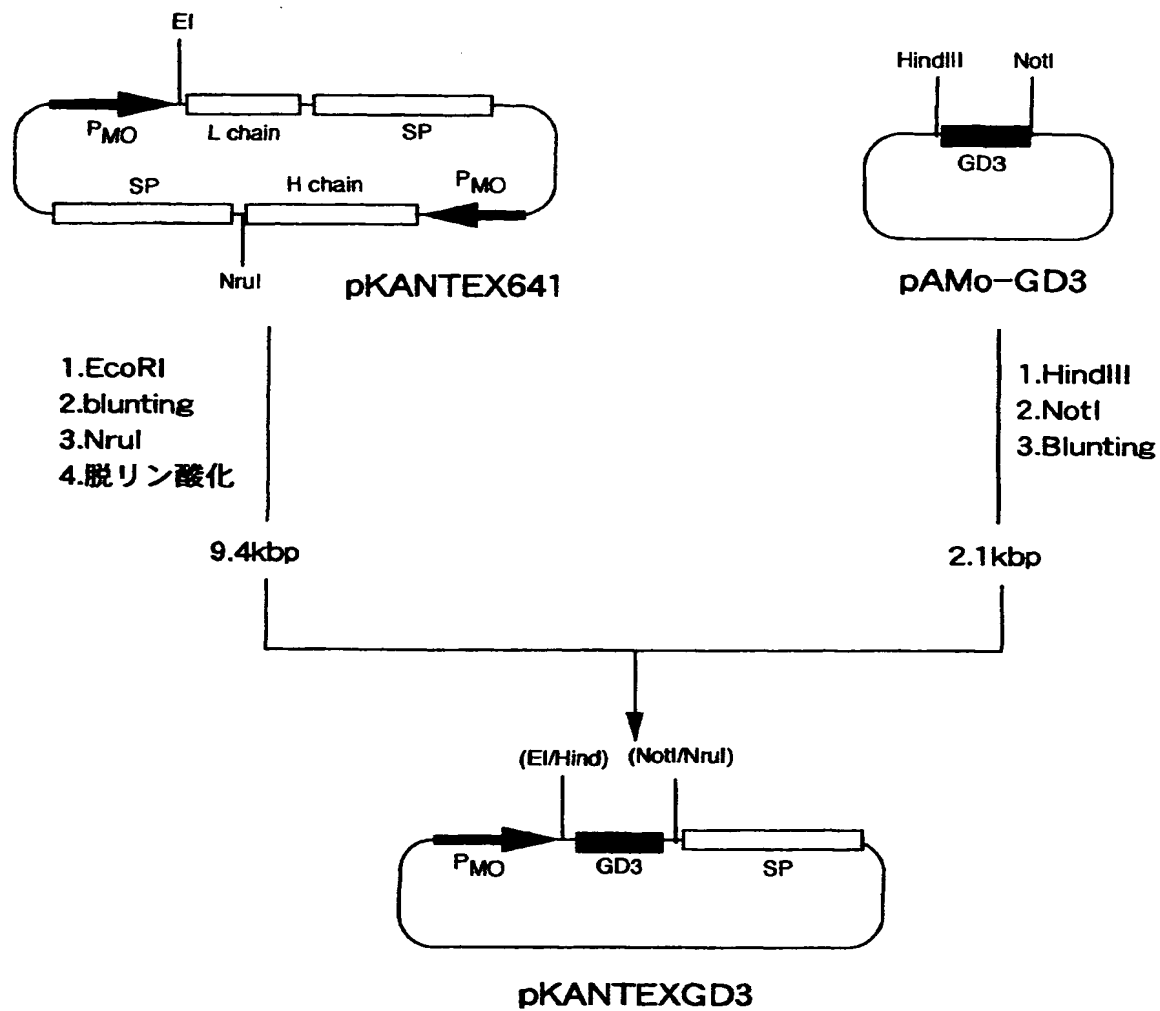
【図 35】



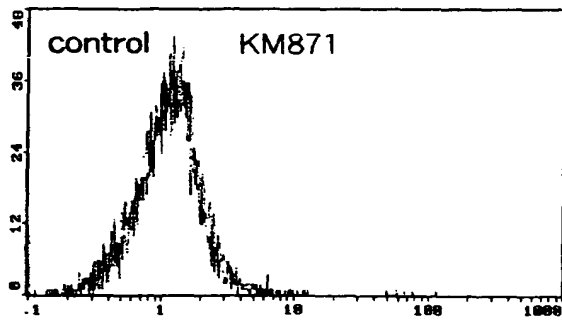
【図 3 6】



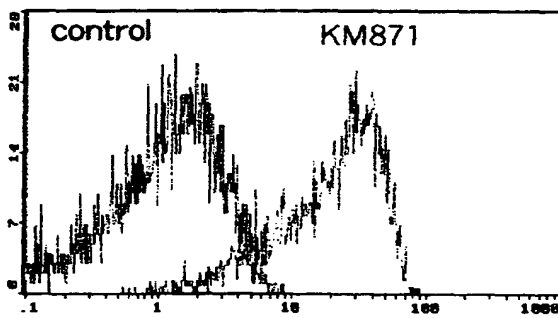
【図 3 7】



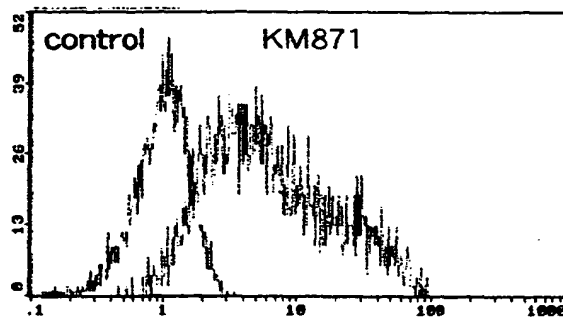
【図38】



B16・F10 (親株)

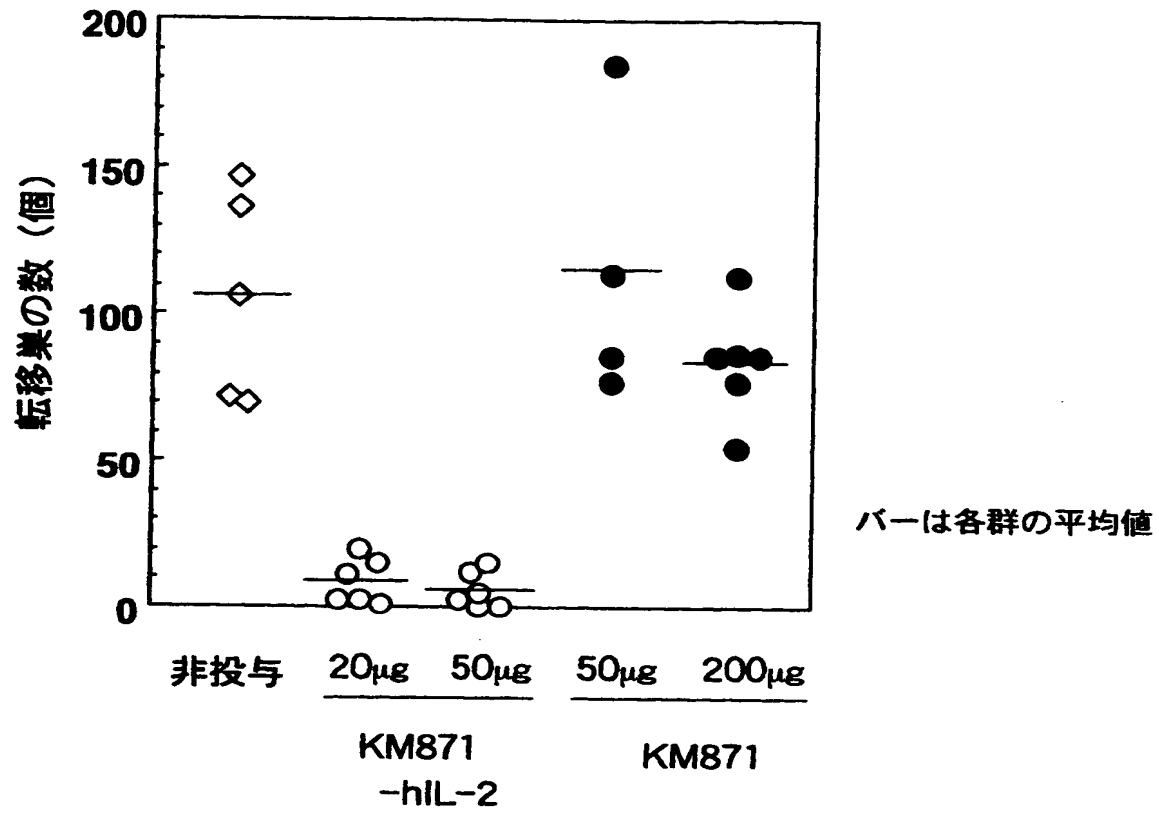


B16・29-10

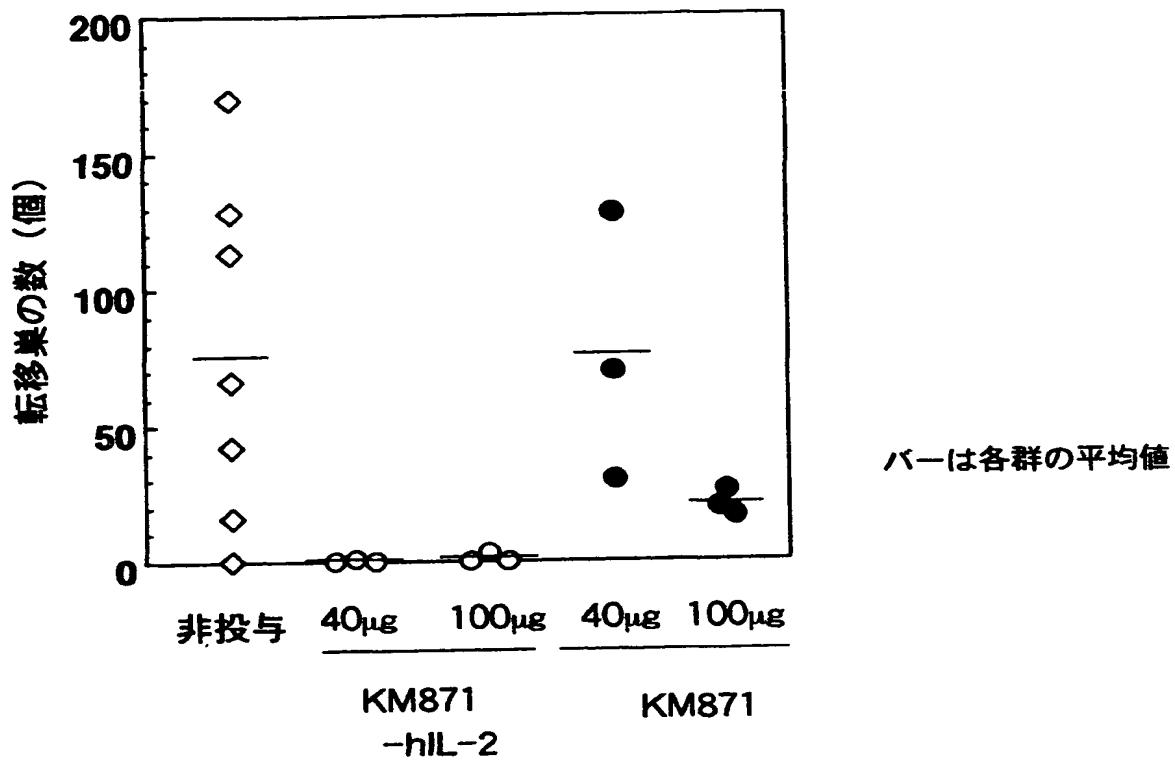


B16・8-3

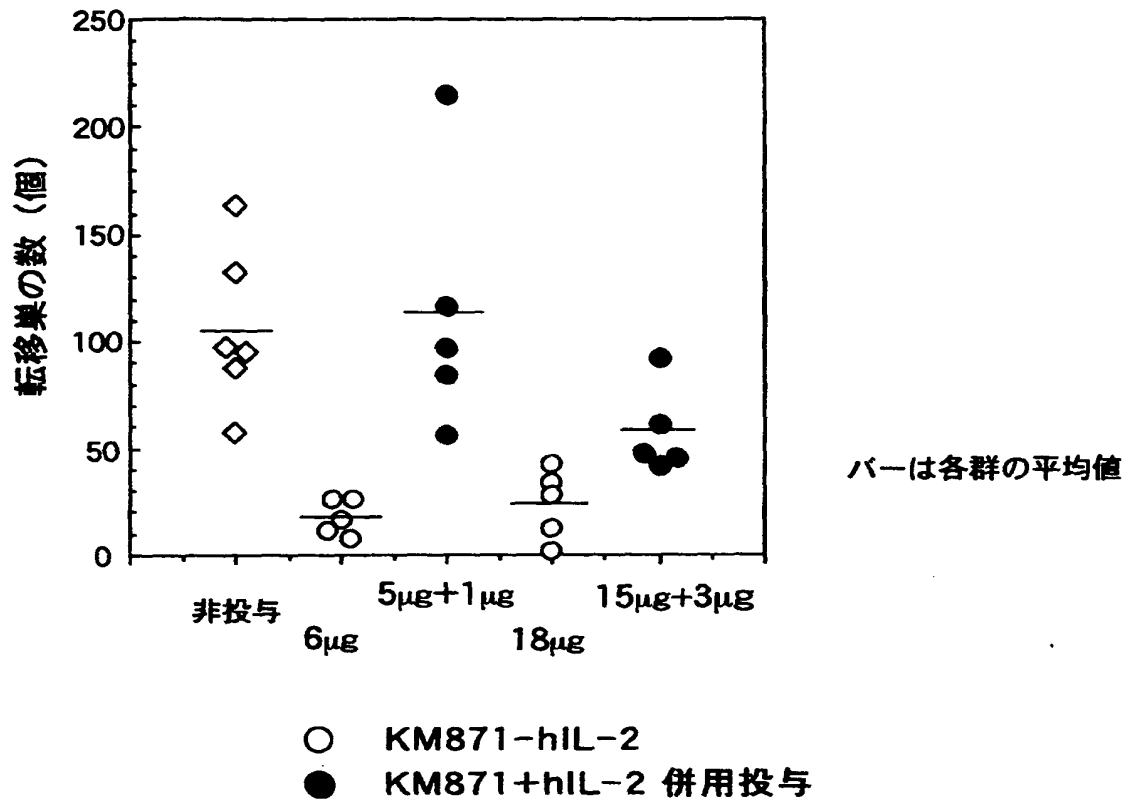
【図39】



【図 40】



【図 4 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腫瘍細胞に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体、抗GD3抗体とサイトカイン等との誘導体が作製できれば、新たなヒトの癌の診断薬、治療薬となることが期待される。

【解決手段】 本発明は、ガングリオシドGD3（以下、GD3と表記する）に対するヒト型CDR移植抗体、抗GD3抗体とサイトカインとの誘導体、ならびに該抗体および該誘導体の治療、診断上の用途に関する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社